metode și tehnici în micologie

ovidiu constantinescu

III-12.553

Ovidiu
Constantinescu

metode și tehnici în micologie

Volumul cuprinde descrierea principalelor metode și tehnici folosite în studiul ciupercilor, în special a celor microscopice, grupate în cinci capitole : colectarea, izolarea, examinarea, cultivarea, conservarea. Lucrarea se adresează specialiștilor care lucrează în microbiologie generală și aplicată, fitopatologie, medicină umană și veterinară și, în general, tuturor celor interesați în studierea acestui grup de organisme.

Supracoperta :

Scopulariopsis brevicaulis

BL. CENTR. UNIV.
„EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE
-12.553

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ovidiu constantinescu
doctor în științe biologice

metode și tehnici în micologie

B.C.U. IASI
794458

Editura „Ceres"
București

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

rado
B. C. U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE
08. 12. 2014

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Volumul de față reprezintă o încercare de sintetizare și sistematizare a informațiilor privind principalele metode și tehnici folosite în studiul ciupercilor. Datorită implicării acestor organisme în ramuri majore ale științei și producției, literatura privitoare la tehnicile de lucru folosite în cercetarea lor este vastă și dispersată. Intenția autorului a fost să ofere, celor interesați în studierea ciupercilor, un instrument util și o sursă de informații asupra tehnicilor și metodelor, atît a celor simple dar de mare utilitate, cît și a celor mai complexe. Dificultatea principală în elaborarea lucrării, în afara culegerii informațiilor din surse uneori greu accesibile, a fost selectarea celor mai importante procedee. Nu am găsit necesară descrierea unor tehnici sau metode comune și altor științe ca microbiologia, histologia, botanica, sau a celor foarte speciale, cu aplicabilitate redusă. Autorul este conștient că n-a putut evita subiectivismul, atît în ceea ce privește alegerea tehnicilor, cît și a spațiului acordat fiecăreia. Pentru compensație, în text s-au făcut trimiteri la lucrări unde tehnicile tratate sumar, sau doar menționate în acest volum, sînt prezentate pe larg de alții. În acest fel sperăm că lucrarea va servi și ca ghid bibliografic.

Autorul este extrem de îndatorat domnului dr. C. Zahariadi — *Atena, pentru nenumărate discuții stimulative și informații privind tehnicile de laborator. Pentru facilități de documentare oferite în timpul stagiului petrecut în 1971 la Centraalbureau voor Schimmelcultures — Baarn, datorăm mulțumiri dr.* J. A. von Arx *și dr.* W. Gams, *precum și prof. dr.* K. Verhoeff, *director la Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten" — Baarn. Fără ajutorul competent al domnișoarei* Sheila Daniels *de la Commonwealth Mycological Institute — Kew, multe lucrări ne-ar fi rămas cunoscute doar din surse secundare. Doamna* Elvira Grou *ne-a pus la dispoziție, cu multă bunăvoință, informații privind unele aspecte de chimie, iar colegul* G. Negrean *ne-a ajutat în diferite etape ale elaborării lucrării.*

Pentru permisiunea de a reproduce unele ilustrații datorăm mulțumiri următorilor:

Academic Press, Londra, pentru fig. 7.

American Association for the Advancement of Science, Washington, pentru fig. 11 și 22 (din Science).

American Phytopathological Society, St. Paul, pentru fig. 5 C, 12, 13, 14 A și 14 B (din Phytopathology).

Association pour les Études et Recherches de Zoologie appliquée et de Phytopathologie, Gembloux, pentru fig. 5 A (din Parasitica).

Burgess Publishing Company, Minneapolis, pentru fig. 14 D.

Cambridge University Press, Londra, pentru fig. 9 și 14 E (din Transactions of the British Mycological Society) și fig. 23 (din Journal of General Microbiology).
Canada Department of Agriculture, Research Branch, Ottawa, pentru fig. 3.
Commonwealth Mycological Institute, Kew, pentru fig. 21.
Department of Scientific and Industrial Research, Wellington, pentru fig. 26 (din New Zealand Journal of Botany).
Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pentru fig. 8 (din Annales des Épiphyties).
International Association for Plant Taxonomy, Utrecht, pentru fig. 4 B (din Regnum vegetabile).
Lane Science Equipment Corp., New York, pentru fig. 28.
Národní Muzeum, Praga, pentru fig. 14 C (din Česká mykologie).
New York Botanical Garden, Bronx, pentru fig. 24 și 25 (din Mycologia).
Springer Verlag, Heidelberg, pentru fig. 10 (din Archiv für Mikrobiologie).
U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, pentru fig. 5 B (din Plant Diseases Reporter).

Mulțumim Editurii „Ceres" pentru încrederea și solicitudinea arătate, precum și Întreprinderii poligrafice „Bucureștii-Noi", pentru atenția acordată realizării grafice a lucrării.

Autorul mulțumește anticipat tuturor celor care îi vor transmite oral sau în scris, observații, mai ales critice, privind acest volum.

O. C.

18 iunie 1974

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

1. COLECTAREA 7
1.1. Note de teren 7
1.2. Ciuperci foliicole 8
1.3. Ciuperci pe ramuri şi tulpini 11
1.4. Ciuperci cărnoase 11
1.5. Ciuperci lignicole 14
1.6. Ciuperci zoopatogene 14
1.7. Myxomycete 14
1.8. Spori de pe plante sau din culturi 15
1.9. Captarea sporilor din aer 16
Bibliografie 18

2. IZOLAREA 20
2.1. Metode generale 20
2.1.1. Izolarea directă 20
2.1.2. Metoda diluţiilor 21
2.2. Izolarea ciupercilor fitopatogene 21
2.2.1. Eliminarea contaminanţilor 21
2.2.2. Ciuperci care sporulează la suprafaţa plantelor 23
2.2.3. Ciuperci din ţesuturi profunde 23
2.2.4. Metode speciale 24
2.3. Izolarea ciupercilor din sol 26
2.3.1. Izolarea directă a hifelor 27
2.3.2. Metoda tuburilor perforate, îngropate 28
2.3.3. Metoda plăcilor perforate, îngropate 29
2.3.4. Lame capcane 29
2.3.5. Dispersia particulelor de sol în mediu 30
2.3.6. Metoda diluţiilor 30
2.3.7. Spălarea solului 31
2.3.8. Metoda capcanelor 32
2.3.9. Alte metode 33
2.3.10. Izolarea ciupercilor antagoniste 33
2.4. Izolarea ciupercilor acvatice 34
2.4.1. Izolarea ciupercilor din apele dulci 34
2.4.2. Izolarea ciupercilor din apele poluate 36
2.5. Izolarea ciupercilor zoopatogene 37
2.6. Izolări monosporale 38
2.6.1. Prepararea mediilor, a suspensiilor şi însămînţarea 38
2.6.2. Izolarea şi transferul sporilor „fără mediu“ 39
2.6.3. Izolarea şi transferul sporilor cu mediul suport 42
2.6.4. Izolarea hifelor 44
2.6.5. Izolarea coloniilor 44
2.6.6. Microchirurgia 45
Bibliografie 45

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. EXAMINAREA 48
3.1. Examinarea ciupercilor microscopice 48
3.2. Examinarea ciupercilor macroscopice 51
3.3. Secţionarea 51
3.3.1. Secţionarea materialelor neincluzionate 51
3.3.2. Secţionarea materialelor incluzionate 53
3.4. Colorarea 53
3.4.1. Colorarea citoplasmei şi a pereţilor celulari 53
3.4.2. Colorarea ciupercilor în ţesuturile gazdei 55
3.4.3. Colorarea nucleilor 59
3.4.4. Colorări speciale 60
3.5. Preparate microscopice 62
3.5.1. Preparate în medii lichide 62
3.5.2. Preparate în medii care se solidifică 68
3.6. Metode pentru observarea creşterii şi morfogenezei 71
3.6.1. Culturi pe suporturi transparente 71
3.6.2. Culturi în „picătură suspendată“ 72
3.6.3. Culturi pe lame şi lamele 72
3.6.4. Culturi în microcamere 74
3.6.5. Microcamere pentru examinarea continuă a conidiogenezei . . . 77
Bibliografie 79

4. CULTIVAREA 83
4.1. Mediile de cultură 83
4.1.1. Componentele mediilor de cultură 83
4.1.2. Prepararea mediilor 85
4.1.3. Păstrarea mediilor 89
4.1.4. Inocularea şi transferul 89
4.1.5. Incubarea 90
4.1.6. Purificarea culturilor 91
4.1.7. Formule şi reţete pentru prepararea mediilor 93
4.2. Culturi pe frunze detaşate 150
Bibliografie 151

5. CONSERVAREA 158
5.1. Conservarea ciupercilor în stare vie 158
5.1.1. Introducere 158
5.1.2. Transferul periodic 160
5.1.3. Conservarea sub ulei de parafină 163
5.1.4. Conservarea culturilor în sol 165
5.1.5. Deshidratarea 165
5.1.6. Conservarea în apă distilată 167
5.1.7. Liofilizarea 167
5.1.8. Conservarea în azot lichid 170
5.1.9. Protecţia culturilor 172
5.2. Conservarea ciupercilor ca materiale de herbar 174
5.2.1. Herbarul micologic 174
5.2.2. Culturi de referinţă 181
5.2.3. Colecţii de preparate 183
5.2.4. Preparate pentru muzeu 184
Bibliografie 186
INDEX DE AUTORI 191
INDEX DE SUBIECTE 201

BCU "BABEŞ-BOLYAI" UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 1

C o l e c t a r e a

Prin colectare se obţin eşantioane ale ciupercilor care, după condiţionare sau prelucrare prin diferite procedee. se pot conserva în colecţii timp îndelungat, păstrîndu-şi în general nemodificate caracterele ce servesc la identificarea lor. Calitatea materialelor conservate depinde în mod esenţial de felul în care s-a făcut colectarea şi prelucrarea. Metodele de colectare, prelucrare, precum şi echipamentul necesar, sînt diferite în funcţie de tipul de ciuperci şi vor fi descrise pentru fiecare grup în parte. Indiferent de felul ciupercilor care se colectează, din echipament nu trebuie să lipsească un cuţit de herborizat, confecţionat dintr-o lamă groasă de oţel, curbată, lungă de 15—20 cm şi lată de 4—5 cm, ascuţită la un capăt şi prevăzută cu mîner, un briceag solid, o lupă de 5—10 ×, un altimetru pentru zonele muntoase şi carnetul de teren.

1.1. Note de teren

Notele de teren cuprind toate informaţiile referitoare la locul şi condiţiile colectării, precum şi unele date necesare pentru identificare. Acestea diferă, în parte, în funcţie de grupul de ciuperci care se colectează, dar cîteva condiţii sînt generale. Astfel, fiecare colector trebuie să ţină evidenţa exemplarelor colectate prin numerotare, de preferinţă în continuare, fără a începe în fiecare an o serie nouă de numere (S a v i l e,

INSTITUTUL DE STIINTE BIOLOGICE - BUCURESTI
Herbarul micologic (BUCM)

Puccinia cnidii Lindroth

II + III, pe frunze de
Cnidium silaifolium (Jacq.)Simonkai

Jud. Vîlcea, Olăneşti, alt. 500 m
Col. C. Zaharia di, 1.IX.1951
Det. T. Săvulescu, 16.IV.1952

BUCM nr. 11435

Fig. 1 — Etichetă permanentă pentru materialul de herbar

BCU IASI/CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

1962 ; Fosberg & Sachet, 1965). Notele se scriu într-un carnet de teren și un fragment de hîrtie, care poartă același număr, se atașează exemplarului colectat, sau pot fi scrise pe etichete de teren provizorii, de asemenea numerotate, care se introduc la un loc cu materialul și vor servi la completarea etichetelor permanente (fig. 1). În general, notele trebuie să cuprindă nu numai informații cum ar fi : vegetația asociată, tipul de sol, altitudinea (importantă în regiunile muntoase), expunerea, panta, locul (cu precizarea unor puncte de reper permanente sau, mai bine, cu coordonatele geografice — Walker, 1942), data, numele colectorului și numărul de colecție etc., dar și caracterele care nu mai pot fi decelate pe exemplarele conservate. Astfel, în cazul ciupercilor parazite pe plante, se vor nota toate datele necesare pentru identificarea gazdei ca : înălțimea, portul, mirosul, culoarea florilor, suculența, gustul (Fosberg & Sachet, 1965). La ciupercile cărnoase este obligatorie notarea habitusului, culorii și formei diferitelor organe, gustului, mirosului etc.

1.2. Ciuperci foliicole

Cele mai importante grupe de ciuperci sînt, în general, foliicole *(Uredinales, Ustilaginales, Erysiphaceae, Peronosporaceae, Meliolineae, Deuteromycotina* etc.). Tehnica de colectare și echipamentul sînt similare cu cele folosite în cazul fanerogamelor.

Deoarece la ciupercile foliicole cunoașterea plantei gazdă este aproape indispensabilă pentru identificarea speciilor — la grupele de rugini studiate de Savile (1971) erorile în determinarea gazdelor deseori depășesc 25% — este necesară colectarea a cel puțin un exemplar complet din planta gazdă.

La colectarea ciupercilor parazite pe plante trebuie ținut seama de particularitățile ciclului lor de dezvoltare. Astfel, la *Peronosporaceae,* trebuie colectate și porțiuni de tulpini, deoarece acestea pot conține oosporii, care nu se află întotdeauna pe frunze (Anonim, 1968). La *Uredinales* este bine de urmărit aceeași plantă, eventual marcînd-o, și de revenit asupra ei, de mai multe ori, pentru colectarea tuturor formelor de spori (Savile, 1962 ; Punithalingam, 1971). În cazul speciilor heteroice de *Uredinales* este indicată căutarea, în apropiere, a gazdelor alternative. La *Erysiphaceae,* după colectarea formei neperfecte, este necesară o revenire pentru căutarea formei cu cleistotecii. Multe specii de *Ascomycetes* pot fi colectate în timpul verii doar ca forme neperfecte și abia toamna tîrziu, sau uneori chiar în primăvara următoare, pe frunzele căzute, se formează organele de înmulțire sexuată.

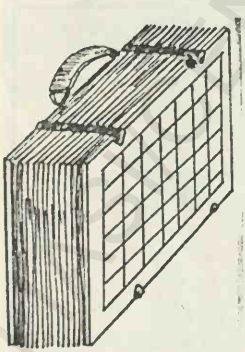


Fig. 2 — Presă de teren, cu arcuri

Deși uneori la colectare se folosesc botaniere sau pungi din polietilenă, care asigură conservarea exemplarelor pînă la presare, totuși metoda cea mai sigură este introducerea materialelor în presa de teren,

imediat după colectare. Există nenumărate modele de prese dar două tipuri par a fi cele mai potrivite. Primul este format din două plase de sîrmă, rigide, prevăzute cu rame din metal ușor, cu dimensiunile de 42 × 29 cm (fig. 2). Între rame se introduc foi duble, de obicei din hîrtie de ziar cu aceleași dimensiuni, precum și cîteva foi de carton ondulat de tipul celui utilizat la ambalaje, pentru aerisire. De una din rame este atașat un mîner, iar cele două rame se pot strînge cu arcuri metalice sau benzi de cauciuc, pentru a asigura o presiune constantă. Al doilea tip de presă (fig. 3) este un fel de mapă, confecționată dintr-un material impermeabil, suficient de rigid și ușor, de preferință o țesătură de nylon cauciucat. Această presă este prevăzută cu două despărțituri, una pentru hîrtia nefolosită, iar cealaltă pentru colile care conțin plante. Detalii în legătură cu confecționarea și modul de folosire al acestui tip de presă se găsesc în cartea lui S a v i l e (1962).

Condiționarea ciupercilor foliicole cuprinde presarea și uscarea frunzelor sau a plantelor întregi. În principal tehnica este identică cu cea utilizată în cazul fanerogamelor și constă în deshidratarea rapidă, la o temperatură nu prea ridicată, pentru a evita schimbarea culorilor naturale, și presarea continuă, pentru a înlătura pericolul încrețirii frunzelor. Pentru presare, plantele se scot din presa de teren și se introduc între coli duble din hîrtie de ziar, curată, nefolosită, cu dimensiuni de 29 × 42 cm. Ordinea în care se aranjează materialele este următoarea : o foaie de carton ondulat, rigid, care se așază cu orificiile pe direcția de circulație a aerului, peste acesta se pune hîrtie de herbar specială, moale, așa-numitele „salteluțe", care se mulează pe neregularitățile

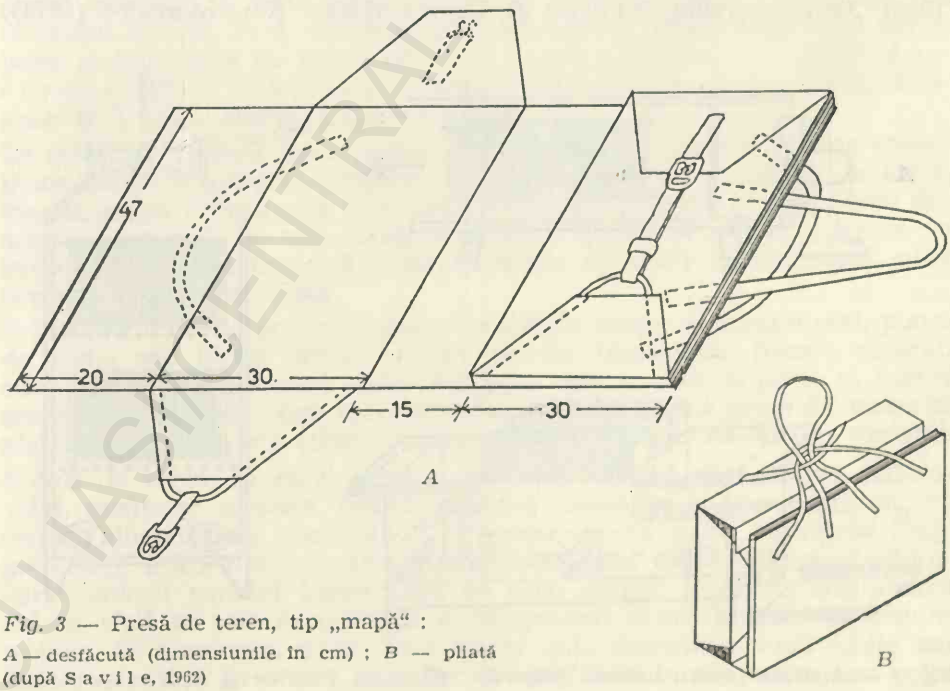
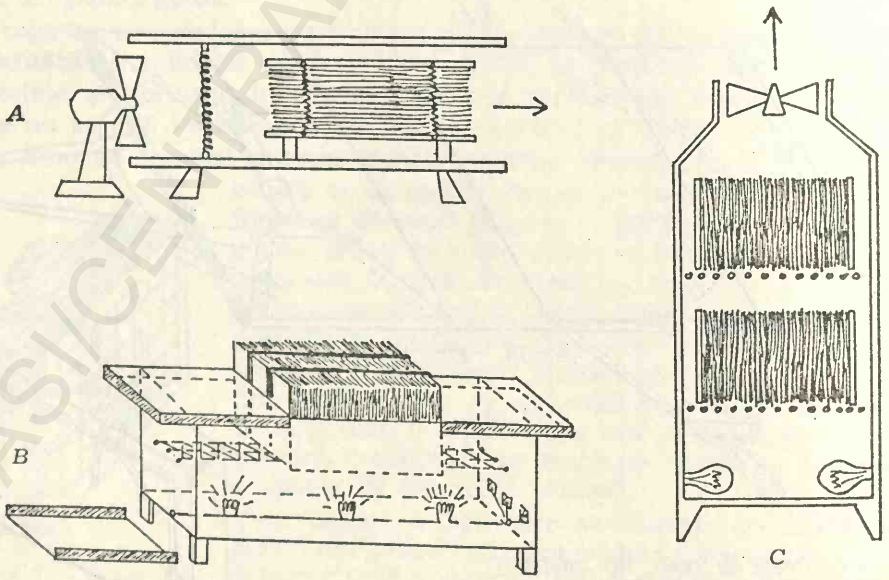


Fig. 3 — Presă de teren, tip „mapă" :
A — desfăcută (dimensiunile în cm) ; *B* — pliată (după S a v i l e, 1962)

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

plantelor, apoi coala de hîrtie de ziar în care este introdusă planta sau frunzele, din nou hîrtie de herbar, carton ondulat ș.a.m.d. În loc de carton ondulat se pot folosi plase de sîrmă cu ochiuri dese, suficient de groase pentru a lăsa aerul să circule. Nu este recomandabil să se înlocuiască hîrtia de ziar cu sugative, deoarece aceasta din urmă este mult prea rigidă, se deteriorează repede și este mai scumpă. Două rame de lemn de forma unui grătar se pun pe ambele părți ale presei și apoi se strîng cu chingi, sau mai bine cu arcuri metalice, în cazul cînd se vor usca în poziție verticală, sau se așază deasupra o greutate, în cazul uscării în poziție orizontală.

Uscarea fără folosirea unei surse artificiale de căldură se face greu și în timp îndelungat, deoarece este necesară înlocuirea hîrtiei, care se umezește, în fiecare zi sau la două zile. Pentru accelerarea procesului de uscare există aparate speciale, prevăzute cu o sursă de căldură constituită din rezistențe sau becuri electrice, și ventilatoare. Temperatura optimă pentru uscarea plantelor este de 55—60°C (Ziller & Lowe, 1968). În fig. 4 sînt ilustrate schematic trei aparate de acest fel, unul orizontal (fig. 4 *A*), conceput de C. Zahariadi, la care presarea se face cu greutăți sau arcuri, iar sursa de căldură este o rezistență electrică, și altele verticale (fig. 4 *B, C)* la care presele sînt strînse cu arcuri sau chingi, iar ca sursă de căldură sînt utilizate becuri de 150 w. Alte modele de aparate de uscat de laborator, sau chiar portabile, sînt descrise de Savile (1962), Fosberg & Sachet (1965), Beard (1968), Jenne (1968), Ziller & Lowe (1968), Ruemmele (1971).



10 *Fig. 4* — Aparate pentru uscarea plantelor (*B*, după Fosberg & Sachet, 1965)

1.3. Ciuperci pe ramuri și tulpini

Pe ramurile arborilor și arbuștilor și pe tulpinile plantelor ierboase, se dezvoltă multe micromicete, în special *Pyrenomycetes*, care se pot recolta cu succes primăvara și iarna. Pentru evitarea transportării inutile de material, ramurile și tulpinile trebuie examinate cu lupa. Fructificațiile apar în general ca mici granule mai mult sau mai puțin cufundate în substrat și, prin strivire cu briceagul, conținutul celor care se află într-un stadiu favorabil de maturare apare ca o masă gelatinoasă, strălucitoare, în timp ce fructificațiile vechi, goale, se sfărîmă ușor în fragmente uscate (Munk, 1957; Booth, 1960). În cazul fructificațiilor complet cufundate în substrat, la care doar osteolul apare la suprafață, trebuie făcută o secțiune pentru evidențierea conținutului.

Gazda la aceste ciuperci trebuie determinată pe teren, deoarece după un fragment este greu de stabilit mai tîrziu identitatea plantei. La plantele ierboase, în jurul tulpinii uscate, apar în anul următor rozete de frunze care facilitează determinarea.

Exemplarele colectate se pot împacheta în hîrtie sau în pungi și nu necesită o prelucrare specială, afară doar de uscare, în cazul cînd s-au colectat umede.

1.4. Ciuperci cărnoase

Din această categorie fac parte reprezentanți din *Agaricales, Gasteromycetales, Clavariaceae, Pezizales* și alte cîteva grupe de ciuperci cu fructificații mai mult sau mai puțin fragile și efemere (Savile, 1962). Ele pot fi colectate în toate anotimpurile, cu excepția iernii. Timpul cel mai favorabil este la 3—4 zile după ploi abundente. Multe informații privitoare la colectarea lor pot fi găsite în lucrările lui Smith (1949), Josserand (1952), Watling (1968), Henderson & al. (1969), Eliade & Toma (1971), LaRue (1971).

La colectare trebuie ținut seama de următoarele: se vor colecta exemplare tinere și mature, complete, cu picior și volvă, neatacate de larve, viermi, melci etc. La cele care cresc pe lemn se va lua și o porțiune din acesta. Ciupercile se vor curăța bine de resturile de pămînt, dar se va evita manipularea excesivă deoarece multe caractere de suprafață, utile pentru identificare, dispar.

Echipamentul necesar constă dintr-un coș de nuiele cu fundul plat, pungi de hîrtie sau hîrtie cerată în care se vor împacheta, fiecare separat, corpurile fructifere mari, cutii metalice pentru cele mijlocii și tuburi pentru cele mici. Nu este recomandabil să se folosească pungi din material plastic. Terakawa (1962) descrie un coș special, cu volum variabil.

Notele de teren, în cazul acestor ciuperci, cuprind date asupra habitusului, plantelor asociate, culorii pălăriei, lamelelor și piciorului, asupra formei, dimensiunii, consistenței, gustului (se va evita înghițirea fragmentelor), mirosului etc. Prezența sucului apos sau culoarea și schimbarea culorii sucului lăptos cînd se rupe corpul fructifer, schimbarea culorii cînd se taie exemplarul și în general orice caracter neobișnuit trebuie, de asemenea, notat. Este foarte utilă executarea unei schițe sau desen, eventual în culori, și chiar fotografierea în alb-negru sau color

COLECTAREA a exemplarelor proaspete (Eliade & Toma, 1971; LaRue, 1971; Watling, 1971).

Analiza caracterelor microscopice cuprinde, printre altele, studierea sporilor. Deoarece aceştia sînt greu de evidenţiat pe exemplarele conservate, este necesar să se obţină o sporogramă. Cea mai simplă tehnică este următoarea: se taie piciorul ciupercii şi corpul fructifer se aşază cu himenoforul în jos, pe o foaie de hîrtie albă. Se pune deasupra un vas de sticlă (Petri sau un borcan) pentru a menţine umiditatea şi, în cîteva ore, sporii se depun pe hîrtie, după care pot fi fixaţi prin pulverizare cu o soluţie din 1 parte colofoniu şi 4 părţi terebentină (Eliade & Toma, 1971). Sporograma se poate obţine şi imediat, pe teren, prin perforarea hîrtiei, trecerea piciorului prin orificiu şi îndoirea hîrtiei astfel ca pălăria să fie împachetată. Se introduce apoi într-o pungă în aşa fel încît, în timpul transportului, lamele să fie îndreptate în jos. Sporograma se păstrează împreună cu exemplarul de la care a fost obţinută.

Josserand (1952) descrie mai multe metode pentru obţinerea sporogramelor în cazul ciupercilor cu corpuri fructifere mici, delicate, care se deshidratează rapid.

Deoarece culoarea sporilor este foarte labilă, Watling (1970) recomandă standardizarea metodelor de obţinere a sporogramelor, prin închiderea corpurilor fructifere în cutii, timp de 1—12 ore, în funcţie de mărime, colectarea sporilor pe lame microscopice, deshidratarea acestora timp de 15 minute în container de material plastic plin cu silicagel şi compararea, la o lupă binoculară, a culorii sporilor cu un cod de culori.

Welsch & Salmon (1948) obţin sporograma pe celofan, din care un fragment este montat în balsam de Canada diluat cu cloroform, pe o lamă, ca preparat semipermanent.

Pentru studierea ulterioară a caracterelor microscopice este recomandată conservarea unor fragmente din corpurile fructifere, într-una din soluţiile: formol 40%, 7 ml + acid acetic glacial, 7 ml + alcool 50—70%, 100 ml (Savile, 1962); alcool 25% + formol 4% (Bas, 1969) sau 15 ml formol 40% + 95 ml apă (Alexopoulos & Beneke, 1968). După Smith (1965) conservarea în soluţii are totuşi dezavantajul că mulţi compuşi chimici, utili pentru identificare, sînt dizolvaţi. De altfel exemplarele de colecţie, care se folosesc în studii taxonomice, nu trebuie niciodată păstrate în lichide (Savile, 1962).

Pentru păstrarea în colecţii ciupercile trebuie deshidratate şi aceasta se obţine prin mai multe metode.

Cea mai simplă metodă este expunerea la soare, timp de cîteva zile, sau înşirarea corpurilor fructifere pe sîrme, în apropierea unor surse de căldură. Ambele procedee au dezavantajul că uscarea se face lent şi larvele pot distruge exemplarele, pînă la obţinerea deshidratării.

Metoda cea mai folosită constă în aşezarea ciupercilor pe plase de sîrmă sub care se instalează plăci electrice sau becuri, astfel încît să se obţină un curent ascendent de aer cu temperatura de 30—40°C (Brummelen, 1967). Prin acest procedeu corpurile fructifere se zbîrcesc şi culorile se schimbă, dar structurile microscopice se păstrează bine (Kendrick, 1969).

După Singer (1963) cea mai bună metodă este cea prezentată de Lundell și Nannfeldt, care deshidratează corpurile fructifere cu ajutorul căldurii artificiale, le reumidifică într-o cameră umedă sau cu vapori de apă pentru a redeveni moi, apoi le presează ușor pentru a putea fi introduse în plicuri normale de herbar.

Silicagelul, un compus cristalin, chimic inactiv, care absoarbe apa rapid din orice obiect umed pus în apropiere, este folosit cu succes și pentru deshidratarea ciupercilor cărnoase (Hoseney, 1963). Se pun ciupercile într-un recipient care poate fi închis ermetic, pe un strat de cristale de silicagel și apoi se așază cristale și în jurul exemplarelor. Deshidratarea durează cîteva ore, în funcție de mărimea corpurilor fructifere. La sfîrșit se înlătură silicagelul de pe suprafața ciupercilor cu o pensulă. Silicagelul poate fi deshidratat în etuvă la 120°C timp de 30 minute și apoi refolosit. Această metodă are avantajul că deshidratează rapid, forma ciupercilor nu se modifică prea mult, larvele insectelor sînt omorîte instantaneu și poate fi folosită direct pe teren, în special în cazul ciupercilor mici ca *Marasmius, Coprinus* etc. (Hoseney, 1963; Smith, 1965).

Loquin (1944) a experimentat, cu bune rezultate, deshidratarea cu raze infraroșii.

Liofilizarea este cea mai bună metodă de conservare deoarece forma, culoarea și chiar caracterele microscopice, se păstrează nealterate (Davies, 1962; Clémençon, 1967). Imediat după colectare ciupercile se pun în congelator la —20 sau —30° și apoi, după 12—24 ore, se trec în liofilizator, unde procesul de deshidratare durează între 1—7 zile, în funcție de volumul corpurilor fructifere. Amănunte în legătură cu acest procedeu sînt date de Haskins (1961), Davies (1962), McClure (1965), Kendrick (1969) și Hanlin (1972), iar aparate concepute special pentru liofilizarea ciupercilor cărnoase sînt descrise de Taylor (1968) și Clémençon (1968). După Smith (1965) prin acest procedeu ciupercile devin fragile și mai puțin potrivite pentru studii taxonomice dar, după Kendrick (1969), este metoda de viitor.

Hintikka (1969) propune o metodă simplificată, prin eliminarea liofilizatorului, metodă în care corpurile fructifere se răcesc la —20° și apoi se țin în continuare la această temperatură, în silicagel, pînă se deshidratează. Procesul durează 1—3 săptămîni pentru ciupercile mici *(Marasmius, Mycena)* sau cîteva luni pentru cele mari *(Boletus)* și necesită doar cîteva înlocuiri ale silicagelului.

Prin metoda secționării corpurilor fructifere și păstrării doar a straturilor exterioare, imaginată de Herpell și descrisă de Lowy (1958), Bohus (1963) și Babos (1966), se obțin exemplare care pot fi conservate cu ușurință în herbar, dar cu valoare mai mult demonstrativă decît științifică, deoarece structurile de suprafață sînt alterate (Singer 1963). Josserand (1952) recomandă doar secționarea în 2 sau 4 a corpurilor fructifere voluminoase.

O metodă puțin utilizată este sterilizarea prin iradiere cu raze X, în containere închise ermetic (Kendrick, 1969).

1.5. Ciuperci lignicole

Ciupercile lignicole, care produc putregaiuri ale lemnului, fac parte din fam. *Polyporaceae, Thelephoraceae* și *Hydnaceae,* dar printre ele sînt și unii reprezentanți ai fam. *Agaricaceae.* Aceste ciuperci, care se pot colecta în tot timpul anului, sînt în general voluminoase și mai rezistente decît cele cărnoase, așa că cer mai puțină grijă la colectare. Deoarece multe sînt specifice anumitor esențe lemnoase, este indicat să se determine gazda și să se colecteze, o dată cu corpurile fructifere, și o porțiune din lemnul gazdei. Deshidratarea acestor ciuperci se poate face cu ușurință în laborator, pe mese, fără a folosi mijloace speciale (S a v i l e, 1962).

1.6. Ciuperci zoopatogene

Ciupercile zoopatogene nu oferă, în general, material care să poată fi păstrat, dar părul uman sau animal, pielea, fragmente de unghii sau coarne, penele etc., infectate cu dermatofiți, constituie eșantioane valoroase, care pot fi conservate în colecțiile micologice de herbar, după ce ciupercile au fost inactivate prin fumigare cu oxid de propilen sau cu formalină (A i n s w o r t h, 1960).

1.7. Myxomycete

Myxomycetele se pot colecta în tot timpul anului, cu excepția zilelor de îngheț, dar, în general, începînd din aprilie-mai. Plasmodiile și apoi sporangii se dezvoltă pe toate materialele organice în descompunere, în special în păduri, pe trunchiuri putrede, sub frunzare, pe mușchi, pe buturugi, pe lemnul depozitat etc., dar se pot întîlni și pe plante vii. La colectare este bine să se rețină și o parte din suportul pe care s-au dezvoltat fructificațiile, deoarece în multe cazuri este specific și deci util la identificare. Unele specii au fructificațiile de mici dimensiuni și acestea pot fi puse în evidență doar prin introducerea suportului, de obicei scoarță de arbori sau resturi vegetale, în camere umede formate din vase Petri.

Deoarece sînt foarte fragile și nu pot fi presate, *Myxomycetele* trebuie colectate în cutii rigide, de carton sau plastic, pentru a evita deteriorarea, precum și amestecarea sporilor de la specii diferite, în timpul transportului. Cele mai bune sînt cutiile căptușite în partea de jos cu plută, în care exemplarul colectat se fixează cu ace cu gămălie.

În general *Myxomycetele* nu necesită o prelucrare specială. Materialul se deshidratează, în cutiile în care a fost colectat, la temperatura laboratorului. Pentru conservare cele mai potrivite sînt cutiile de carton, de aproximativ 8 × 4 × 1,5 cm. Materialul se fixează cu un adeziv pe partea interioară a capacului iar pe partea exterioară a acestuia se lipește eticheta. Se pot folosi cu succes și cutiile de chibrituri.

Indicații privind colectarea, condiționarea și conservarea *Myxomycetelor* sînt date de S a v i l e (1962), A l e x o p o u l o s & B e n e k e (1968); M a r t i n & A l e x o p o u l o s (1969), C h a s s a i n (1970) și C a r l i l e (1971).

1.8. Spori de pe plante sau din culturi

Pentru prepararea inoculului în cercetările de patologie, sau pentru studierea proprietăților sporilor, este necesară obținerea unei cantități însemnate de material. Metodele utilizate în mod obișnuit constau în detașarea sporilor de pe plante sau din culturi cu ajutorul unor spatule, bisturie, ace spatulate, sau chiar în scuturarea plantelor ori a culturilor și colectarea sporilor pe o foaie de hîrtie. Aceste procedee sînt laborioase și nu asigură materialului colectat, un grad înalt de puritate.

Dispozitivele moderne, denumite în general colectoare-ciclon, se bazează pe aspirarea sporilor și depozitarea în recipiente. Sporii astfel obținuți pot fi folosiți imediat pentru inoculări ori alte scopuri sau se pot conserva. Majoritatea modelelor de colectoare-ciclon au fost concepute pentru colectarea uredosporilor de la *Uredinales*, în scopul folosirii lor ca inocul în cercetările de rezistență a plantelor la atacul acestor ciuperci. Eficiența colectoarelor-ciclon este maximă cînd sporii au un diametru minim de 4 μm (T e r v e t & al., 1951). În fig. 5 sînt reprezentate trei tipuri de colectoare. Pentru aspirare aparatele sînt cuplate la o pompă de vid iar sporii se colectează în tuburi sau alte recipiente de sticlă (T e r v e t & al., 1951 fig. 5, C ; T e r v e t & C a s s e l l, 1951 ; B r o w d e r, 1968 fig. 5, B) pe discuri din hîrtie de filtru (S o m m e r e y n s, 1968, fig. 5, A) sau în tuburi de hîrtie (W o o d b u r y & al., 1967). Aparatele descrise de autorii citați se folosesc pentru colectarea unor cantități mici de spori, de obicei dintr-o singură pustulă de rugină. C h e r r y & P e e t (1966) au descris un aparat, bazat pe același principiu, care permite colectarea unor cantități mai mari de spori, de pe plante crescute în seră sau chiar în cîmp.

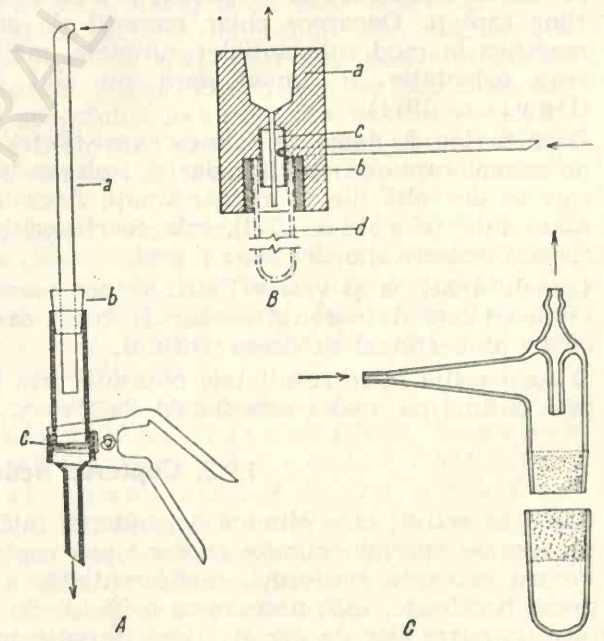


Fig. 5 — Colectoare pentru spori. Săgețile indică accesul și evacuarea aerului :

A : a — tub de sticlă ; *b* — dop de plută ; *c* — hîrtie de filtru (după S o m m e r e y n s, 1968). *B : a* — corp din aluminiu ; *b* — garnitură de cauciuc ; *c* — tub pentru ghidarea sporilor ; *d* — fiolă de sticlă (după B r o w d e r, 1968). *C :* confecționat din sticlă, partea inferioară detașabilă (după T e r v e t & al., 1951).

1.9. Captarea sporilor din aer

Aerul atmosferic sau cel din încăperi, conține, în afara unor particule inerte, microorganisme, printre care spori sau fragmente de ciuperci. Majoritatea acestor spori provin de la ciupercile parazite pe plante sau de la cele saprofite, larg răspîndite. Totodată aerul conține și spori ai ciupercilor care produc boli alergice sau infecțioase la om și animale. Colectarea acestor spori se poate face în mod pasiv, prin expunerea unor suprafețe pe care sporii se depun datorită gravitației sau a curenților de aer, sau prin metode active, în care aerul este aspirat, iar sporii sînt colectați prin diferite procedee. După Gregory (1968), scopul captării sporilor, pentru patologia plantelor, este de a determina încărcătura de patogeni purtați de curenții de aer, de a prevedea epidemiile, de a obține date asupra periodicității invaziilor cu spori de ciuperci parazite asupra culturilor de plante, de a sincroniza aplicarea tratamentelor și a altor măsuri de combatere etc. De asemenea, captarea sporilor poate da informații utile despre agenții care produc alergii respiratorii sau pentru detectarea putregaiului uscat al lemnului din construcții, produs de *Serpula lacrymans*. Gregory (1961 ; 1973) și Davies (1971) tratează pe larg metodele de colectare și izolare a sporilor aflați în aer.

1.9.1. Captarea pasivă

Captarea pasivă este metoda cea mai simplă și a fost folosită în mod extensiv. Lame de sticlă unse cu glicerină gelatinată, unsori cu siliconi sau vaselină, se așază cu suprafața gresată în sus, pe suporturi neacoperite, dacă se folosesc în încăperi, sau, în cazul utilizării în aer liber, sub adăposturi, pentru a le feri de ploaie. După un timp de expunere lamele se analizează la microscop pentru identificarea și numărarea sporilor captați. Deoarece chiar curenții de aer foarte puțin intenși pot modifica în mod substanțial rezultatele, metoda trebuie folosită doar în scop orientativ și numai dacă nu sînt alte mijloace la dispoziție (Davies, 1971).

Dacă în loc de lame se folosesc vase Petri cu mediu, atunci se obține nu numai captarea sporilor dar și izolarea lor, prin transferul coloniilor care se dezvoltă din sporii germinați. Această metodă, deși se mai utilizează încă (Kallio, 1971), este foarte criticată pentru faptul că favorizează izolarea sporilor mari și grei.

Lamele unse, ca și vasele Petri, se pot așeza și vertical, sau la diferite unghiuri față de curenții de aer. În acest caz cantitatea de spori captați crește proporțional cu viteza vîntului.

O comparație între rezultatele obținute prin captarea pe lame gresate și prin culturi pe mediu este făcută de Frey & Durie (1962).

1.9.2. Captarea activă

Captarea activă, care elimină dependența față de curenții de aer, se face cu aparate speciale numite capcane sau captatori de spori (spore-traps). Pentru captarea uniformă, nediferențiată, a sporilor de dimensiuni și greutăți diferite, este necesar ca orificiul de captare să fie îndreptat pe direcția curenților de aer și viteza de pătrundere a aerului prin orificiu

să fie egală cu viteza curenţilor de aer din locul şi momentul cînd se face operaţia de captare. Acest deziderat este satisfăcut, în parte, de aparatele moderne de captat.

Există două tipuri principale de aparate. Unele denumite „de impact", la care aerul este aspirat prin orificii de diferite forme şi dimensiuni, în dreptul orificiilor fiind montate lame gresate sau vase Petri cu mediu, pe care sporii aderă, şi altele denumite „impingers", la care sporii şi celelalte particule din aerul aspirat sînt captaţi în apă sau alte lichide.

Modele de aparate „de impact" sînt descrise de Bourdillon & al. (1948), fabricat de C. F. Casella and Co. Ltd., London, şi de May (1945). La ultimul, viteza jetului de aer, în interiorul aparatului, este variabilă, astfel că sporii de dimensiuni şi greutăţi diferite se depun pe lame separate. Cel mai folosit este aparatul lui Hirst (1952), produs tot de Casella and Co., care aspiră 10 l aer pe minut şi permite măsurarea orară, timp de 24 ore, a cantităţii de aer aspirat şi a sporilor conţinuţi de acesta. Într-o variantă perfecţionată — fabricată de Anderson Samplers and Consulting Service, 1074 Ash Avenue, Provo, Utah, USA sau de Burkhard Manuf. Co., Rickhmansworth, Herts., Anglia — aparatul Hirst poate capta sporii timp de 7 zile, pe o bandă transparentă cu adeziv, şi permite, de asemenea, evaluarea cantităţii captate în fiecare oră. În cazul unor curenţi foarte slabi, aparatul Hirst, din cauza inerţiei, nu se îndreaptă cu orificiul de captare pe direcţia curenţilor. Datele obţinute, în acest caz, nu pot fi interpretate în mod corespunzător deoarece nu este înregistrată şi direcţia în care a fost îndreptat aparatul. Pentru remedierea acestui neajuns, Crosby & al. (1973), au descris un dispozitiv care se adaptează aparatului Hirst, şi care permite înregistrarea continuă a direcţiei în care se află îndreptat orificiul de captare.

La aparatul descris de Andersen (1958) aerul este aspirat şi trecut prin plăci perforate, cu orificii de diferite dimensiuni, sub care se află vase Petri cu mediu. Vasele Petri de sticlă sînt mai potrivite pentru acest scop decît vasele din material plastic. Discurile cu orificii mari sînt aşezate la partea superioară a aparatului, în apropierea deschiderii pentru admisia aerului, iar cele cu orificii mici la partea opusă. Se realizează astfel o captare diferenţiată a sporilor, cei mari fiind reţinuţi în primele vase Petri.

McCoy & Dimock (1971) descriu un aparat la care captarea se face pe bandă de celofan cu adeziv (Scotch-tape). Această bandă elimină multe dezavantaje ale captării pe lame gresate, cum ar fi dificultatea de colorare a sporilor, depunerea de particule străine în timpul păstrării (deoarece lamele gresate nu se pot acoperi cu lamelă), imposibilitatea deosebirii sporilor vii de cei neviabili etc.

Alte aparate sau dispozitive de impact sînt descrise de Panzer & al. (1957), Pady (1959), Hopkins (1959), Husain (1963), Schenck (1964), Kramer & Pady (1966), Davis & Sechler (1966), Burleigh & al. (1967), Ramalingam (1968), Arnold (1969), Casselman & Berger (1971) şi McCracken (1971).

La aparatele numite „impingers" aerul este aspirat cu putere printr-un orificiu, după care trece în lichidul de captare. Aceste aparate au avantajul că pot fi folosite la analizarea aerului saturat cu spori sau particule, situaţie în care aparatele de impact nu dau rezultate mulţumitoare, de-

oarece numărul de spori sau particule pe suprafața adezivă sau pe mediul din vasele Petri este prea mare. De asemenea, în cazul captării în vase Petri, speciile care cresc repede le estompează sau chiar le elimină pe celelalte. Analiza sau izolarea ciupercilor din lichidul de captare se face prin metoda diluțiilor. Variante moderne ale acestui aparat sînt descrise de May & Harper (1957), May & Druett (1953) și May (1966), ultimul fiind produs de A. W. Dixon & Co. Annerley Station Road, Londra.

1.9.3. Sporii ciupercilor fitopatogene

Colectarea din aer a sporilor ciupercilor parazite pe plante se poate face și prin expunerea, în zonele de cercetat, în perioadele de maximă diseminare a sporilor, fie a unor plante cultivate în ghivece, fie a porțiunilor de plante menținute în soluții. Prin acest procedeu, folosit mai ales la studierea epidemiologiei făinărilor și ruginilor, sporii sau conidiile din aer vin în contact cu plantele și produc infectarea acestora. Hermansen & al. (1967) folosesc în acest scop, pentru studierea sporilor aflați în straturile superioare ale atmosferei, un captator format dintr-un tub de sticlă în care se introduc frunze de orz. Frunzele funcționează ca filtru și substrat. După expunere, frunzele se păstrează 8—10 ore la 10°, iar apoi se pun în soluții de 13 ppm benzimidazol și se urmărește apariția făinării produse de *Erysiphe graminis* și a ruginii provocate de *Puccinia hordei*.

Bibliografie

AINSWORTH, G. C. (1960) — In „Herb. I.M.I. Handbook", p. 83—84. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

ALEXOPOULOS, C. J. & BENEKE, E. S. (1968) — „Laboratory Manual for Introductory Mycology". Burgess Publishing Co., Minneapolis.

ANDERSEN, A. A. (1958) — *J. Bact.*, 76 : 471—484.

ANONIM (1968) — „Plant Pathologist's Pocketbook". Commonwealth Mycological Institute, Kew.

ARNOLD, A. J. (1969) — *Lab. Pract.*, 18 : 1067—1069.

BABOS, L. (1966) — *Mikol. Közl.*, : 27—32.

BAS, C. (1969) — *Persoonia*, 5 : 285—579.

BEARD, J. S. (1968) — *Taxon*, 17 : 744.

BOHUS, G. (1963) — *Mycologia*, 55 : 128—130.

BOOTH, C. (1960) — In „Herb. I.M.I. Handbook", p. 76—78. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

BOURDILLON, R. B., LIDWELL, O. M. & SCHUSTER, E. (1948) — *Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun.*, No. 262 : 12—19. HMSO, London.

BROWDER, L. E. (1968) — *Pl. Dis. Reptr*, 52 : 148.

BRUMMELEN, J. van (1967) — *Persoonia*, 1 (supl.) : 1—260.

BURLEIGH, J. R., KRAMER, C. L. & COLLINS, T. I. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 434—436.

CARLILE, M. J. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 4 :237—265. Academic Press, London & New York.

CASSELMAN, T. W. & BERGER, R. D. (1971) — *Proc. Fl. St. hort. Soc.*, 83 : 191—195.

CHASSAIN, M. (1970) — *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 86 : 98—105.

CHERRY, E. & PEET, C. E. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 1102—1103.

CLÉMENÇON, H. (1968) — *Schweiz. Z. Pilzk.*, 46 : 33—40.

CROSBY, F. L., SMITH, D. H. & HUGHES, J. E. (1973) — *Pl. Dis. Reptr*, 57 : 244—246.

DAVIES, D. A. L. (1962) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 45 : 424—428.

DAVIES, R. R. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology" Vol. 4 : 367—404. Academic Press, London & New York.

DAVIS, D. R. & SECHLER, D. (1966) — *Pl. Dis. Reptr*, 50 : 906—907.

ELIADE, E. & TOMA, M. (1971) — „Ciuperci". Edit. Didactică și Pedagogică, București.

FOSBERG, F. R. & SACHET, M.—H. (1965) — „Manual for Tropical Herbaria". *Regnum veg.*, 39 : 1—132.
FREY, D. & DURIE, E. B. (1962) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 16 : 295—303.
GREGORY, P. H. (1961) — „The Microbiology of the Atmosphere". Leonard Hill Ltd., London and Interscience Publishers Inc., New York.
— (1968) — In „Plant Pathologist's Pocketbook", p. 178—180. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
— (1973) — „The Microbiology of the Atmosphere". Ed. 2. Leonard Hill, London.
HANLIN, R. T. (1972) — *Bull. Torrey bot. Club*, 99 : 23—27.
HASKINS, R. H. (1961) — *Mycologia*, 52 : 161—164.
HENDERSON, D. M., ORTON P. D. & WATLING, R. (1969) — „British Fungus Flora. Agarics and Boleti : Introduction". H. M. Stationery Office, Edinburgh.
HERMANSEN, J. E., JOHANSEN, H. B. & HANSEN, H. W. (1967) — *Kgl. Vet.— & Landbohøjskole, Årsskr.* 1966 : 61—67.
HINTIKKA, V. (1969) — *Mycologia*, 61 : 202—203.
HIRST, J. M. (1952) — *Ann. appl. Biol.*, 39 : 257—265.
HOPKINS, J. C. (1959) — *Can. J. Bot.*, 37 : 1277—1278.
HOSENEY, F. V. (1963) — *Mich. Bot.*, 2 : 125—126.
HUSAIN, S. M. (1963) — *Phytopathology*, 53 : 382—384.
JENNE, G. (1968) — *Taxon*, 17 : 184—185.
JOSSERAND, M. (1952) — „La description des champignons supérieurs". Paul Lechevalier, Paris.
KALLIO, T. (1971) — *Karstenia*, 12 : 36—45.
KENDRICK, W. B. (1969) — *Mycologia*, 61 : 392—395.
KRAMER, C. L. & PADY, S. M. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 517—520.
LaRUE, J. I. (1971) — *Mich. Bot.*, 10 : 89—93.
LOQUIN, M. (1944) — *Bull. Soc. linné. Lyon*, 13—14.
LOWY, B. (1958) — *Mycologia*, 50 : 442—444.
McCLURE, F. W. (1965) — *Plateau*, 37 : 95—98.
McCOY, R. E. & DIMOCK, A. W. (1971) — *Pl. Dis. Reptr*, 55 : 832—834.
McCRACKEN, F. I. (1971) — *Phytopathology*, 61 : 250—251.
MARTIN, G. W. & ALEXOPOULOS, C. J. (1969) — „The Myxomycetes". Univ. of Iowa Press, Iowa City.
MAY, K. R. (1945) — *J. scient. Instrum.*, 22 : 187—195.
— (1966) — *Bact. Rev.*, 30 : 559—570.
— & DRUETT, H. A. (1953) — *Br. J. ind. Med.*, 10 : 142—151.
— & HARPER, G. J. (1957) — *Br. J. ind. Med.*, 14 : 287—297
MUNK, A. (1957) — *Dansk bot. Ark.*, 17 : 1—491.
PADY, S. M. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 757—760.
PANZER, J. D., TULLIS, E. C. & VAN ARSDEL, E. P. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 512—514.
PUNITHALINGAM, E. (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology". Vol. 4 : 193—218. Academic Press, London & New York.
RAMALINGAM, A. (1968) — *Env. Health*, 10 : 61—67.
RUEMMELE, M. (1971) — *Natura*, 57—58.
SAVILE, D. B. O. (1962) — „Collection and Care of Botanical Specimens". Canada Dept. of Agriculture, Ottawa.
— (1971) — *J. Indian bot. Soc.*, 50 A : 41—51.
SCHENCK, N. C. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 613—614.
SINGER, R. (1963) — *Mycologia*, 55 : 683—684.
SMITH, A. H. (1949) — „Mushrooms in their Natural Habitat". Oregon.
— (1965) — *Taxon*. 14 : 121—126.
SOMMEREYNS, G. (1968) — *Parasitica*, 24 : 40—42.
TAYLOR, L. D. (1968) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51 : 600—603.
TERAKAWA, H. (1962) — *Trans. mycol. Soc. Japan*, 3 : 50—51.
TERVET, I. W. & CASSELL, R. C. (1951) — *Phytopathology*, 41 : 286—290.
— RAWSON, A. J., CHERRY, E. & SAXON, R. B. (1951). *Phytopathology*, 41 : 282—285.
WALKER, E. H. (1942) — *Chron. bot.*, 7(2) : 70—71.
WATLING, R. (1968) — *J. Quekett microsc. Club*, 31 : 95—105.
— (1970) — *Bull. Br. mycol. Soc.*, 4 : 48—49.
— (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 219—236. Academic Press, London & New York.
WELSCH, M. & SALMON, J. (1948) — *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 141 : 1587—1588.
WOODBURY, W., MACKO, V. & STAHMANN, M. A. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 455.
ZILLER, W. G. & LOWE, D. P. (1968) — „A Herbarium for Forest Pathology". Forest Res. Lab., Inf. Rep. BC—X—22, Victoria.

BOSTON UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 2

Izolarea

Prin izolare, elemente de reproducere vegetativă, sexuată ori fragmente ale talului ciupercilor, sînt detaşate de substratul organic sau anorganic pe care s-au dezvoltat, sau sînt extrase din mediul în care se găsesc (sol, aer, apă) şi cultivate, în condiţii artificiale, în vederea studierii lor. Folosind diferite metode, ciupercile izolate pot fi păstrate multă vreme în stare vie.

2.1. Metode generale

2.1.1. Izolarea directă

Ciupercile formează uneori fructificaţii abundente la suprafaţa suportului pe care se dezvoltă, lucru ce poate fi observat chiar cu ochiul liber. În acest caz suportul, sau o porţiune din acesta, se aşază sub o lupă binoculară şi, cu ajutorul unui ac de însămînţat ascuţit, umectat în mediu nutritiv, se detaşează unul sau mai mulţi spori, conidii sau chiar porţiuni din miceliu, care se însămînţează pe un mediu de cultură. Pentru evitarea contaminărilor cu bacterii, la mediu se adaugă bactericide sau se acidifică (vezi pag. 91—93).

Pentru stimularea sporulării, se ţine substratul, înainte de izolare, timp de cîteva ore sau zile, într-o „cameră umedă" constituită din cîteva rondele de hîrtie de filtru umectate cu apă sterilă, puse într-un vas Petri, de asemenea sterilizat. Pentru menţinerea umidităţii timp de 3—4 săptămîni, Keyworth (1951) recomandă introducerea în vasul Petri, în afara rondelelor, şi a unor fîşii de pulpă de hîrtie, groase de 10 × 3 mm, care se aşază împrejurul marginii interioare a vasului Petri. Cu această metodă s-au obţinut 80—90% culturi pure la izolarea unor specii de *Cercospora* de pe plante infectate natural, chiar fără folosirea bactericidelor. Procentul de culturi pure, în cazul izolărilor directe, depinde în mare măsură de faptul dacă ciupercile au crescut în amestec sau nu pe suportul lor natural.

În cazul ciupercilor dezvoltate pe substraturi care nu pot fi transportate sau fragmentate (material de construcţii lemnos sau metalic, ziduri, opere de artă ca frescele, statuile etc.), o metodă foarte eficace este cea propusă de V. Caumartin şi descrisă de Hennebert (1960): În eprubete de aproximativ 8,5 cm lungime şi 1 cm diametru se toarnă un mediu nutritiv la care s-a adăugat un bactericid (fig. 6, *a*). În dopuri de plută cu diametru convenabil pentru a etanşa eprubetele se introduc sîrme de nichelină de aproximativ 5—7 cm lungime şi se sterilizează în etuvă (fig. 6, *b*). Se înlocuiesc, la flacără, dopurile de vată ale eprubetelor,

cu dopurile de plută în care s-a fixat sîrma de nichelină. Eprubetele astfel preparate se numerotează și se pot păstra în frigider timp îndelungat (fig. 6, c). Pentru izolare, în imediata apropiere a locului unde se află ciuperca, sau unde se presupune prezența unor ciuperci, se scoate dopul, ținînd eprubeta cu deschiderea în jos, și cu sîrma, care funcționează ca un ac de însămînțat, se detașează o porțiune din fructificații sau miceliu și se transferă pe mediu, prin reintroducerea dopului în eprubetă. Metoda are, printre altele, avantajul esențial că elimină sterilizarea repetată a acului de însămînțat, lucru foarte greu de realizat pe teren. După cîteva zile, în eprubete se dezvoltă colonii ale ciupercilor, care pot fi transferate în eprubete de dimensiuni obișnuite sau în vase Petri.

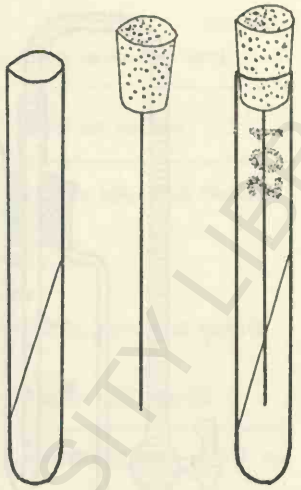


Fig. 6 — Eprubetă cu dop și ansă, pentru izolări directe pe teren

2.1.2. Metoda diluțiilor

Metoda diluțiilor se folosește atunci cînd ciupercile sînt slab dezvoltate pe substrat, cresc în amestesc mai multe ciuperci, sau ciuperci cu alte microorganisme.

După Raper & Fennell (1965) un gram din materialul de analizat se pune în 9 ml apă sterilă care conține un umectant (de exemplu lauril sulfonatul de sodiu în concentrație de 1 : 10 000 sau 1 : 1 000 000). O cantitate foarte mică din această suspensie se transferă cu ajutorul unei anse, însămînțîndu-se în 3—4 striuri, pe suprafața mediului agarizat care conține și bacteriostatice, turnat în vase Petri. Suspensia inițială poate fi diluată în continuare pînă cînd, prin inocularea unui ml de suspensie pe suprafața mediului, se vor dezvolta numai 3—6 colonii. Mediul poate fi însămînțat și prin depunerea unui ml de suspensie în vasul Petri, apoi turnarea mediului răcit la 45° și rotirea plăcilor pentru distribuirea uniformă a suspensiei. În toate aceste cazuri ciupercile se vor izola cu acul, prin metoda directă, din coloniile separate, dezvoltate la suprafața mediului.

Diluțiile succesive se pot prepara și cu ajutorul unei seringi sterile (Moore & Kommedahl, 1947).

2.2. Izolarea ciupercilor fitopatogene

2.2.1. Eliminarea contaminanților

Aproape întotdeauna pe organele plantelor, în afara ciupercilor parazite, se află și bacterii sau ciuperci saprofite. Dacă izolarea nu se face rapid, sau dacă materialul nu este ținut la temperatură scăzută după colectare, atunci țesuturile vegetale sînt invadate de contaminanți, care fac izolarea foarte dificilă dacă nu chiar imposibilă.

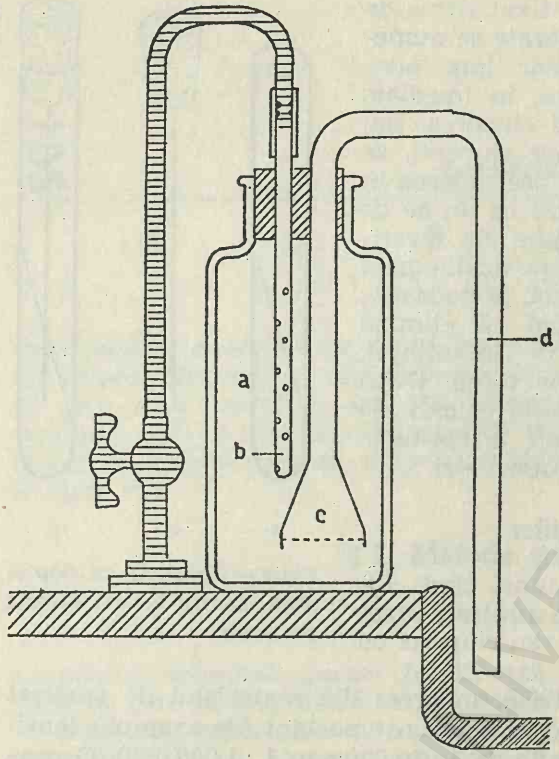


Fig. 7 — Dispozitiv pentru spălarea fragmentelor de plante (după Booth, 1971)

Metoda cea mai simplă pentru îndepărtarea contaminanților este spălarea cu apă într-o instalație ca cea din fig. 7, compusă dintr-un flacon *(a)* în care se pun fragmentele de plante, un tub perforat *(b)* pentru accesul și barbotarea apei și o sită *(c)* care împiedică ieșirea din aparat a fragmentelor de plante, prin tubul de evacuare *(d)*. Spălarea trebuie combinată cu agitarea continuă a materialului și este indicată în special în cazul ciupercilor sensibile la substanțele chimice (Booth, 1971). Deși prin această metodă nu se obține sterilizarea țesuturilor, o mare parte din contaminanți sînt îndepărtați.

Sterilizarea la suprafață se poate face și prin gazare cu oxid de propilen. Într-un borcan care poate fi închis ermetic se pun fragmente de 3—4 cm din materialul ce urmează să fie sterilizat (în special părți lemnoase) și se introduc 2 ml oxid de propilen, pe un tampon de vată. După 30 minute se deschide borcanul, cu o lamă sterilizată se taie și se elimină extremitățile materialului, iar partea centrală se secționează în fragmente mici care se pun pe mediul de cultură care conține bactericide (Booth, 1971).

Cînd se folosesc sterilizanți sub formă de soluții procedeul este următorul : se spală materialul și se taie în fragmente de aproximativ 1 cm lungime. Se imersează în alcool 75% și imediat în soluția de sterilizare. După scoaterea din soluție se spală de mai multe ori în apă sterilă, se zvîntă între foi de hîrtie de filtru sterilă, se secționează și se transferă pe mediul de cultură. Sterilizanții principali, timpii de utilizare și agenții de spălare sînt enumerați în tabelul 1.

Felul sterilizantului care se folosește și timpul de tratament depind de densitatea materialului vegetal și de sensibilitatea ciupercii. Pentru stabilirea lor sînt necesare testări prealabile. Atenție specială trebuie acordată eliminării complete a substanței sterilizante, în special în cazul rădăcinilor fine sau a organelor spongioase. Pentru verificare, se pune un fragment din țesutul sterilizat pe un mediu care a fost însămînțat cu suspensie de spori a unei ciuperci test. Dacă apar zone de inhibiție în jurul fragmentului înseamnă că sterilizantul este încă prezent în țesut (Parkinson & al. 1971).

Tabelul 1

STERILIZAREA LA SUPRAFAȚĂ A MATERIALULUI VEGETAL (după Booth, 1971)

Sterilizantul	Concentrația %	Timp (minute)	Soluția de spălare
Formaldehidă (40%)	51	1—5	Alcool etilic 70% apoi apă sterilă
H_2O_2	3	1—5	Apă sterilă
$KMnO_4$	2	1—5	Apă sterilă
Hipoclorit de Ca sau Na	0,35	1—5	Apă sterilă
$HgCl_2$*	0,1	1—5	Alcool etilic 70% apoi apă sterilă
Alcool etilic	75	1—5	Apă sterilă
$AgNO_3$	1	1—5	NaCl sterilă apoi apă sterilă

* Se prepară din 5 ml soluție stoc (la 20 g $HgCl_2$ se adaugă HCl concentrat pînă la 100 ml) și 995 ml apă.

2.2.2. Ciuperci care sporulează la suprafața plantelor

Izolarea ciupercilor care sporulează ușor la suprafața organelor plantei gazdă (în special *Hyphomycetes, Coelomycetes, Ascomycetes,* care produc pătări ale frunzelor) necesită sterilizarea fragmentelor de țesut vegetal, stimularea sporulării prin introducere în camere umede (vezi pag. 20) și apoi izolarea directă (vezi pag. 20—21).

2.2.3. Ciuperci din țesuturi profunde

În cazul ciupercilor care parazitează țesuturile profunde și care, de obicei, nu sporulează la suprafața organelor atacate, este necesară sterilizarea, spălarea, secționarea țesuturilor și depunerea fragmentelor pe un mediu de cultură. După cîteva zile, din miceliul care se dezvoltă în jurul fragmentului de țesut, se poate izola agentul patogen. Este bine să se aleagă porțiunile de la limita dintre țesuturile sănătoase și cele afectate. În cazul organelor voluminoase (tuberculi, bulbi, tulpini, rădăcini groase etc.), la detașarea porțiunilor care vor servi ca inocul

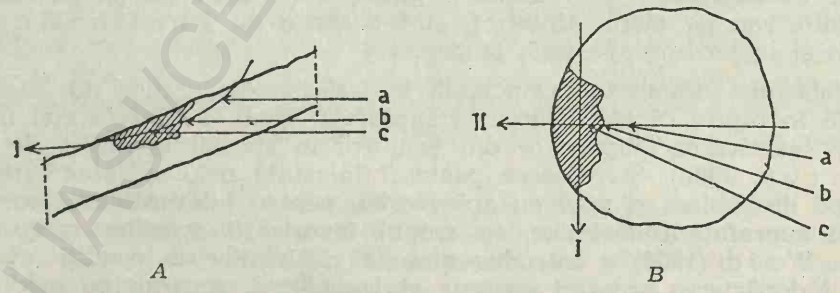


Fig. 8 — Izolarea ciupercilor din țesuturile profunde ale organelor atacate :
A — tije sau ramuri. *B* — organe voluminoase : *a, b, c* — locurile de prelevare a țesuturilor ; *I* și *II* — direcția și ordinea de secționare (după Rapilly, 1968)

 este obligatoriu ca secționarea să se facă dinspre țesutul sănătos spre cel lezat. În figura 8 este reprezentat (după Rapilly, 1968), schematic, modul de obținere a fragmentelor. Pentru secționare se va folosi un bisturiu sau o lamă, sterilizate în alcool și flambate.

2.2.4. Metode speciale

Pentru izolarea ciupercilor de pe unele organe ale plantelor sau izolarea anumitor grupe de ciuperci s-au adaptat unele metode speciale.

A. **Frunze.** Schreurs (1964) elimină sterilizarea frunzelor, care uneori poate produce și inactivarea parazitului, în felul următor : pe ambele fețe ale porțiunii de limb aleasă se lipește bandă de celofan adeziv. Dacă banda a fost bine lipită țesuturile se pot păstra proaspete timp de cîteva zile. Pentru izolare se alege o zonă afectată de ciupercă, se sterilizează suprafața celofanului cu alcool 96%, cu o foarfecă sterilizată se taie o porțiune triunghiulară și se pune pe mediu nutritiv. Ciuperca va crește la marginile frunzei care vin în contact cu mediul. Izolarea lui *Phytophthora infestans* de pe frunzele de cartof se poate realiza prin procedeul descris de Riker & Riker (1936) și Altman (1966) : Se spală tuberculi sănătoși, se șterg cu tifon, se sterilizează prin tamponare cu alcool 95% și se taie aseptic în două. Între cele două jumătăți se introduce o frunză atacată de mană, se fixează tuberculul cu o bandă de cauciuc și se pune într-o cameră umedă, la 18°. După 2—3 zile ciuperca a pătruns în tubercul. Se taie tuberculul perpendicular pe suprafața afectată de parazit și în 4—5 zile fructificațiile ciupercii apar pe suprafața astfel secționată.

Pentru izolarea ciupercilor prezente pe suprafața frunzelor, așa numita „filofloră", Rapilly (1968) recomandă următorul procedeu : se pulverizează suprafața frunzei cu o soluție de geloză 1%, astfel încît să se obțină o peliculă subțire. După solidificare, se deslipesc porțiuni mici care se fragmentează și se pun pe mediul extract de malț-agar. După incubare, coloniile care apar sînt transferate în eprubete. Prin această tehnică se poate obține o imagine destul de corectă a florei suprafețelor foliare și, totodată, se poate diferenția micoflora de pe cele două fețe ale limbului.

Metode pentru izolarea de pe frunze a ciupercilor din ordinele *Uredinales* și *Ustilaginales*, în vederea obținerii de culturi pe plante, frunze detașate, sau pe medii sintetice, sînt descrise pe Punithalingam (1971) și în volumul de față, la pag. 15.

B. **Rădăcini.** Dificultatea principală la izolarea ciupercilor din rădăcini constă în faptul că sterilizarea la suprafață produce de cele mai multe ori și inactivarea ciupercilor din țesuturi, în special la rădăcinile fine (Warcup, 1960). Sterilizarea poate fi înlocuită prin spălarea repetată cu apă de robinet și apoi cu apă sterilă, pentru înlăturarea ciupercilor de la suprafața rădăcinilor, în scopul favorizării speciilor care cresc încet. Waid (1956) a introdus disecția rădăcinilor în condiții sterile, prin îndepărtarea scoarței externe și inocularea, separat, pe mediu, a scoarței interne și a cilindrului central. Pentru izolarea ciupercilor din rădăcinile fine, Warcup (1959) propune următoarea metodă : După spălarea cu apă de robinet și apă sterilă se taie rădăcinile în fragmente

de 1—15 mm lungime, în funcţie de diametru şi se pun în apă sterilă, într-un vas Petri. Înainte de turnarea mediului, care conţine bacteriostatice, fiecare segment este disecat cu ajutorul a două ace şi fragmentele de aproximativ 1 mm obţinute, sînt dispersate în mediu. Se localizează şi se marchează pe spatele vasului Petri poziţia acestor fragmente, pentru a urmări apariţia hifelor.

Tot pentru izolarea ciupercilor din rădăcini foarte fine, Singh (1965) foloseşte următorul procedeu, care constituie o modificare a metodei descrisă de Stover & Waite (1953) : Se spală rădăcinile de 12 ori, în flacoane de 250 ml care conţin cîte 100 ml apă sterilă, folosind un agitator. Se transferă rădăcinile aseptic, în 100 ml apă sterilă, într-un mixer, unde se omogenizează 30—60 secunde. Cu o pipetă Pasteur se depun cîteva picături din suspensia obţinută, pe mediu, în vase Petri. Prin rotire se distribuie inoculul pe toată suprafaţa mediului. După 4—7 zile de incubare apar colonii separate din care se izolează ciupercile. Wilhelm (1956) a reuşit să demonstreze prezenţa unor paraziţi în rădăcini prin următoarea metodă : Se spală şi se sterilizează rădăcinile active şi apoi se îngroapă în nisip umed, steril, în vase Petri de 5 cm adîncime. Pentru menţinerea umidităţii se acoperă vasul cu capace în care, în prealabil, s-a turnat un strat de mediu 2% agar. După 2—5 săptămîni de incubare rădăcinile se scot şi se examinează la lupa binoculară. Ciupercile care au fructificat pot fi transferate pe mediu, folosind metoda izolării directe, sau pot fi examinate în preparate microscopice.

C. **Tuberculi.** I. Niederhauser, citat de Altman (1966), descrie o metodă de izolare a agentului manei cartofului *(Phytophthora infestans),* prin inocularea unui tubercul sănătos cu miceliu dezvoltat pe tuberculii atacaţi. Se obţin fructificaţii care pot fi păstrate la 6° timp de o săptămînă sau mai mult, sau se pot transfera pe mediu de cultură.

D. **Izolarea de pe resturi de plante,** din ţesuturi descompuse, se poate face prin metoda descrisă de Rapilly (1968) : Rondele de morcov sau cartof, sterilizate şi apoi imersate în soluţii de antibiotice, se pun în vase Petri. Pe ele se depun porţiuni din ţesutul bolnav şi se introduc în termostat. Ciupercile, care se dezvoltă pe rondele, se vor izola prin metoda directă.

Bruehl & al. (1964) folosesc, pentru izolarea lui *Cephalosporium gramineum* de pe paiele de grîu, următoarea metodă : Segmente de aproximativ 3—3,5 cm lungime se spală cu apă de robinet, se taie în 8 părţi egale şi se pun, cîte 4, în vase Petri, pe mediul făină de porumb-agar, acidificat (după sterilizare se aduce la pH 4,8 cu 2 ml de acid lactic 25% la litrul de mediu). Fiecare fragment se rostogoleşte pe mediu astfel încît conidiile să adere la acesta, se incubează la 6—10° timp de de 10—14 zile şi se izolează ciuperca din coloniile care se dezvoltă pe mediu.

E. **Seminţe.** *Metoda Ulster* (Malone & Muskett, 1964). Se pun seminţele, nedezinfectate, pe mediul extract de malţ-agar, se examinează după 5 zile de incubaţie la 22° şi se izolează ciupercile din miceliul dezvoltat în mediu, în jurul seminţei. În general, se va evita dezinfectarea seminţelor. De altfel seminţele păstrate 1—2 ani sînt mai puţin infestate (Chandler & Kilpatrick, 1967). Totuşi, pentru înlăturarea unor ciuperci cu creştere rapidă ca *Alternaria alternata,* în special în cazul

izolării de pe semințe proaspete, se recomandă folosirea cloraminei (Muskett & Malone, 1956) sau, mai bine, utilizarea tratamentului termic (o oră la 100°), înainte de așezarea semințelor pe mediu. Folosirea soluțiilor de hipoclorit de Na de diferite concentrații și cu o durată variabilă, permite punerea în evidență, în mod diferențiat, a germenilor de la suprafață sau a celor din profunzimea tegumentului (Rapilly, 1968). În cazul cerealelor, se dezinfectează cariopsele timp de 1—2 minute într-o soluție alcoolică de hipoclorit de Na, se spală de cîteva ori în apă sterilă, se zvîntă între hîrtii de filtru sterile, se pun cu șanțul ventral în jos pe mediul extract de malț-agar, sau, după Noble (1968), pe mediul cartof dextroză agar. După 4 zile de incubație la 20° se izolează coloniile apărute. O a doua izolare se face la 3—4 zile după prima (Rapilly, 1968).

Incubarea în camere umede (Noble, 1968). Cînd se folosește această metodă, semințele, de obicei, nu se dezinfectează în prealabil sau, în cazul cînd sînt foarte contaminate, se sterilizează la suprafață cu o soluție de cloramină 1%, timp de 10 minute. Semințele, dezinfectate sau nu, se pun pe hîrtie de filtru umedă, în vase Petri, sau mai bine în cutii din material plastic, transparent, care se închid ermetic. Ultimele au avantajul că mențin umiditatea ridicată și se pot supune semințele tratamentului cu raze în spectrul apropiat de UV, ceea ce stimulează sporularea. După o incubare de 2—7 zile se analizează la lupa binoculară și se izolează, prin metoda directă, ciupercile dezvoltate pe tegumentul semințelor.

F. **Lemn.** Metodele de izolare a ciupercilor care atacă lemnul sînt descrise de Greaves & Savory (1965) și Grant & Savory (1968).

2.3. Izolarea ciupercilor din sol

Nu există o metodă unică, prin care toate microorganismele prezente în sol să fie izolate, deoarece solul este un sistem extrem de heterogen, care oferă condiții favorabile pentru o mare varietate de microorganisme cu necesități de creștere extrem de diverse (Parkinson & al., 1971). Rezultatele obținute cu diferite metode variază foarte mult, atît în ceea ce privește numărul ciupercilor izolate, cît și frecvența anumitor grupe sistematice. Mici modificări de tehnică pot avea ca urmare o modificare substanțială a spectrului ciupercilor izolate (tabelul 2).

Agnihothrudu (1962), folosind 5 metode diferite, izolează între 35 și 85 de specii, în funcție de metodă, iar Rao (1970) izolează 63 și 65 specii cu metoda diluțiilor și dispersiei particulelor de sol, 35 prin îngroparea rădăcinilor și 11 prin metoda capcanelor. După Chesters & Thornton (1965) metoda plăcilor perforate dă rezultate apropiate de cea a tuburilor perforate și a izolării directe a hifelor, dar diferite de metoda diluțiilor și cea a dispersiei particulelor.

În general, metodele de izolare a ciupercilor din sol se împart în metode directe (izolarea hifelor, metoda plăcilor și tuburilor perforate, lamelor capcană), prin care sînt izolate în special hifele active, metode indirecte (dispersia particulelor, diluții, spălarea solului), prin care se izolează cu precădere ciupercile care sporulează abundent, și metode selective (capcane, izolarea ciupercilor antagoniste etc.).

Tabelul 2

VARIABILITATEA REZULTATELOR ÎN FUNCȚIE DE METODA DE IZOLARE
(după Warcup, citat de Moore-Landecker, 1972)

	Metoda de izolare						
	diluții	dispersia particule sol	izolări din : hife	rizomorfe	scleroți	fructificații	Nr. total specii
Ciuperci inferioare	18	17	11	0	0	11	26
Ascomycetes a) *Discomycetes*	0	0	0	0	3	4	5
b) altele	8	10	3	0	1	5	18
Basidiomycetes	0	0	8	8	7	12	30
Fungi imperfecti	81	60	16	0	2	24	95
Micelii sterile	29	23	59	1	2	0	85
Număr total specii	136	110	97	9	15	56	—

În lucrările de sinteză ale lui Warcup (1960), Boullard (1967), Barron (1971), Parkinson & al. (1971) și Kirilenko (1973) sînt descrise pe larg aproape toate metodele de izolare a ciupercilor telurice.

Deoarece solul este prin excelență un depozit de microorganisme, există tendința de a neglija condițiile de sterilitate.

În timpul colectării probelor, a introducerii în sol a dispozitivelor pentru izolare, sau în laborator, în cursul operațiilor de izolare, trebuie evitată contaminarea cu germeni străini. Toate instrumentele folosite la colectare trebuie să fie sterile, iar expunerea la aer să fie de scurtă durată. Cel mai adesea probele se colectează în eprubete sterile dar, particulele de sol care aderă, în special pe dopurile de vată, introduc aproape întotdeauna germeni nedoriți. Pentru colectare este mai indicată folosirea unor seringi medicale, din material plastic, modificate în acest scop (Brandsberg & Piggott, 1968).

Pentru toate etapele de izolare a ciupercilor din sol se vor folosi medii care conțin bacteriostatice (vezi pag. 93).

2.3.1. Izolarea directă a hifelor

Izolarea directă a hifelor (Warcup, 1955 ; 1960) se bazează pe faptul că, la prepararea suspensiilor de sol, multe hife rămîn atașate de particulele cele mai grele care, în mod obișnuit, sînt eliminate cînd se folosește procedeul diluțiilor. Un grăunte de sol de aproximativ 1—1,5 g, obținut prin sedimentare sau prin cernere cu o sită cu rețea de 50 μm diametru, se examinează microscopic pentru prezența hifelor. Hifele, sau porțiuni din masa de hife, se transferă cu ajutorul unei pense fine, într-o picătură de apă sterilă pusă într-un vas Petri. După ce se depun 20—50 hife, se toarnă în vas mediul topit dar răcit la 45° și hifele se dispersează prin agitare. Prin observarea reversului plăcii se localizează hifele și se marchează poziția lor. Plăcile se incubează la temperatura camerei și se examinează zilnic. Deși localizarea și examinarea hifelor este laborioasă și obositoare, ea este obligatorie, deoarece de hife pot fi atașate particule

de humus, conidii sau spori și trebuie stabilit cu certitudine că creșterile provin de la hife și nu de la alte particule fungice. Porțiuni din hifele care cresc se transferă pe mediu, în eprubete. Această metodă, în afara datelor despre ciupercile care sînt prezente în sol ca micelii, permite și izolarea unor specii care sînt de obicei neglijate în studiile de acest fel. După Parkinson & al. (1971) metoda nu este aplicabilă în studiile care necesită analizarea unor probe numeroase.

2.3.2. Metoda tuburilor perforate, îngropate

Metoda tuburilor perforate, îngropate („immersion tubes") (Chesters, 1940 ; 1948) permite izolarea ciupercilor din sol „in situ", în condițiile de umiditate și temperatură în care ele trăiesc în mod obișnuit.
În eprubete sau tuburi de sticlă rezistentă se practică fie 9 orificii de 0,5 mm diametru, dispuse în spirală și cu deschidere la nivelul peretelui tubului (fig. 9, *a*), fie 6 orificii obținute prin invaginarea peretelui și prelungite în interior cu capilare de dimensiuni și orientări diferite (fig. 9 *b*). Tuburile se sterilizează și se umplu cu mediu răcit, pînă la nivelul orificiului superior, păstrîndu-le în timpul și după operație în alt tub, pentru a evita contaminarea (fig. 9, *d*). Pentru izolare, se extrage o porțiune cilindrică de sol, se scoate tubul cu mediu din tubul de protecție și se introduce imediat în spațiul creat în sol, pînă la adîncimea dorită. Partea superioară a tubului se acoperă cu un capac de sticlă, pentru a evite umectarea dopului de vată. După 7—14 zile se scoate din sol, se transportă în laborator în condiții sterile, se extrage mediul din interiorul tubului cu ajutorul unei baghete sterilizate, (fig. 9 *c*), se fragmentează mediul și se inoculează pe plăci Petri cu mediu proaspăt, obținîndu-se astfel colonii din ciupercile care s-au dezvoltat în dreptul orificiilor.

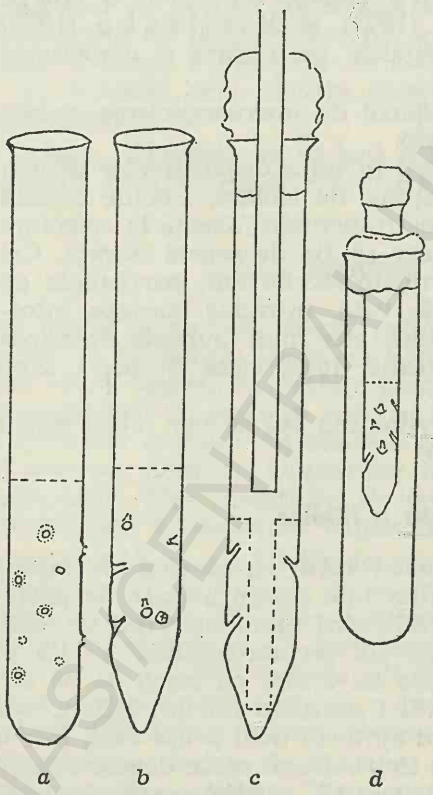


Fig. 9 — Tuburi perforate pentru izolarea ciupercilor din sol (după Chesters, 1940)

Felul mediului acționează asupra ciupercilor (Boullard, 1967). Prin includerea în medii a rădăcinilor de tomate, ridichi sau salată, Martinson & Baker (1962) au reușit izolarea lui *Phytophthora*, *Fusarium* și *Rhizoctonia solani*. Gochenaur (1964) folosește tuburi mai mici și sol în loc de mediu agarizat, iar Mueller & Durell (1957) au înlocuit tuburile de sticlă cu unele din material plastic.

2.3.3. Metoda plăcilor perforate, îngropate

Metoda plăcilor perforate, îngropate („Screened immersion plates") (Thornton, 1952; Wood & Wilcoxon, 1960) permite izolarea ciupercilor aflate sub formă de hife în sol, fără a deranja populațiile de microorganisme și materiile organice.

Metoda inițială (Thornton, 1952) constă în confecționarea unei cutii înguste din material plastic, în care se introduce o lamă de sticlă de 8,5 × 4 cm. Pe suprafața lamei se depune un strat de mediu apă-agar. Capacul cutiei este prevăzut cu orificii prin care hifele au acces la mediu. Wood & Wilcoxon (1960) au simplificat metoda în felul următor : Se confecționează din material plastic discuri cu diametrul de 8,5 cm și grosimea de 1 mm. Se taie 12 orificii de 2 mm diametru. Discurile se sterilizează prin imersiune în alcool etilic 95% și flambare, sau prin vapori, în autoclav, 20 minute la 121°. Se toarnă în vase Petri aprox. 25 ml mediu apă-agar. După răcire se așază pe suprafața mediului discul perforat, se acoperă vasul cu capacul și se păstrează la rece pînă la folosire. Pentru izolare se ridică capacul și se presează vasul Petri pe un profil proaspăt tăiat în sol, astfel ca discul să fie în contact strîns cu solul. Vasul se acoperă cu foi de aluminiu și apoi cu sol. După două sau mai multe zile, în funcție de umiditatea solului, vasele Petri se ridică, se marchează poziția orificiilor pe spatele vasului, se înlătură discul perforat, se examinează la lupa binoculară suprafețele care au fost în dreptul orificiilor și se izolează ciupercile, prin transferul hifelor în eprubete sau vase Petri cu mediu proaspăt.

Thornton (1958) înlocuiește plăcile cu bare cilindrice de metal inoxidabil, prevăzute cu orificii în care se toarnă mediul, Andersen & Huber (1965) folosesc, în mod similar, bare din material plastic, iar Akhtar (1967; 1968) aduce noi perfecționări metodei plăcilor perforate, îngropate.

După Chesters & Thornton (1956) această metodă face posibilă izolarea unui spectru de specii mult mai larg decît metoda diluțiilor sau cea a dispersiei particulelor de sol.

2.3.4. Lame capcane

Două lame microscopice, prevăzute cu cîte 1, 2 sau 3 concavități, folosite în mod obișnuit pentru culturi în „picătură suspendată", se sterilizează prin imersiune în alcool și flambare. Se pipetează o cantitate mică de mediu agarizat în fiecare concavitate a uneia dintre lame și se lasă să se solidifice, într-un vas Petri steril. După răcire, se așază deasupra cealaltă lamă, astfel ca mediul să fie închis între cele două concavități dispuse față în față. Lamele se fixează cu cleme metalice sau benzi de cauciuc, se sterilizează la suprafață și se îngroapă în sol. După aproximativ o săptămînă se scot și se verifică dacă hifele au pătruns pînă la mediul agarizat. Dacă nu, se mai păstrează un timp în camere umede. Pentru izolare se desfac lamele, și tot mediul, dacă este colonizat de o singură hifă, sau fragmente, dacă a fost invadat de mai multe hife, se transferă, în condiții sterile, pe mediu proaspăt (La Touche, 1948). Sewell (1956), a obținut rezultate similare cu cele realizate prin metoda tuburilor îngropate, folosind o microcameră foarte îngustă, confec-

 ţionată din sticlă organică, în care se toarnă o peliculă de mediu şi se acoperă cu o lamelă de 24 × 56 mm. Lamela se fixează cu cleme. După îngroparea în sol, ciupercile pătrund între lamă şi marginea microcamerei şi pot fi izolate apoi, prin transferarea porţiunilor de mediu care conţin hife.

Gams (1959 a ; 1959 b), propune următoarea metodă : Un fragment de nylon subţire, cu dimensiunile de aproximativ 90 × 10 mm, este secţionat în lungime, în fîşii de 1 mm lăţime, lăsînd extremităţile netăiate. Nylonul se ataşează pe o lamă microscopică, prin fixarea capetelor cu ajutorul unei benzi adezive. Se sterilizează în alcool şi se introduce în sol. După o săptămînă, sau mai mult, se scoate şi se trece imediat într-o cameră umedă. În laborator se spală cu apă sterilă, se taie transversal fîşiile cu un bisturiu, iar fragmentele obţinute se aşază pe mediu nutritiv care conţine bacteriostatice, toate operaţiile efectuîndu-se în condiţii sterile. Prin examinare la lupa binoculară, se marchează pe spatele vasului Petri poziţia fragmentelor de nylon care poartă hife, şi acestea se vor urmări zilnic, pentru a izola numai coloniile care se formează prin creşterea hifelor. Pentru izolarea ciupercilor celulozolitice se poate înlocui nylon-ul cu celofan.

2.3.5. Dispersia particulelor de sol în mediu

Cu o microspatulă sterilizată se pun 5—15 mg sol într-o picătură de apă sterilă, pe fundul unui vas Petri sterilizat şi se agită. Se adaugă 8—10 ml mediu (Czapek-Dox + 0,5% extract de drojdii, pH = 4), răcit la 45° şi se dispersează particulele de sol în mediu prin agitarea şi rotirea vasului Petri pînă la solidificarea mediului. Se incubează la 25°, se examinează zilnic şi se transferă hifele din coloniile dezvoltate. În cazul unor soluri cu micoflora săracă cantitatea de sol se poate mări. Metoda este simplă şi permite izolarea unor specii care se află sub formă de micelii ataşate particulelor de sol şi care nu se pot pune în evidenţă prin folosirea metodei izolării directe sau a diluţiilor. Această metodă a fost descrisă de Warcup (1950) sub numele de „soil plate".

Parkinson (1957) şi Johnson & Manka (1961), au adus diferite modificări, neesenţiale, la metoda lui Warcup.

2.3.6. Metoda diluţiilor

Metoda diluţiilor este inspirată de procedeul descris de Waksman (1927), pentru izolarea bacteriilor din sol. O cantitate cunoscută de sol se introduce într-un volum de apă sterilă şi se agită cu ajutorul unui agitator magnetic sau cu bile de sticlă. Se fac diluţii succesive folosind apă sterilă. Agitarea continuă în timpul preparării diluţiilor este esenţială pentru obţinerea unui număr mare de colonii (Hornby, 1969). Un ml din diluţia aleasă se pune într-un vas Petri sterilizat, se adaugă mediul Martin cu pH = 4, răcit la 45°, şi se agită pînă la solidificarea mediului. Se folosesc de obicei diluţiile de 1/1000 şi 1/100 000, sau altele, care să permită obţinerea a aproximativ 25 colonii pe o placă (Warcup, 1960). Barron (1971), foloseşte pentru diluţii mediul apă-agar 0,15%, în loc de apă sterilă, iar Öner (1972), recomandă utilizarea, în acelaşi scop, a sucurilor de plante.

Aceasta este cea mai folosită și cea mai critică metodă, în special datorită faptului că favorizează izolarea ciupercilor care sporulează abundent (Barron, 1971).

Paharia & Kommedahl (1954), propun ca turnarea suspensiei de sol să se facă pe suprafața mediului solidificat, la 2—3 zile de la turnarea mediului, ceea ce are ca rezultat obținerea unui număr de colonii de 2—3 ori mai mare decît dacă se toarnă mediul peste suspensia de sol.

După Flannigan (1973), nu atît metoda folosită — turnarea mediului topit peste inocul, sau inocularea mediului după răcire și solidificare — influențează numărul de ciuperci izolate, cît mai ales temperatura la care mediul este turnat, și această influență este evidentă în special în cazul izolării levurilor. Rodriguez-Kabana (1967) folosește o seringă sterilă cu ajutorul căreia suspensia de sol, fără a fi diluată, este pusă ca picături în vase Petri, apoi amestecată cu mediul. Se determină greutatea medie a solului, pentru o picătură de suspensie, iar numărul de colonii obținute se raportează la greutatea uscată a solului.

2.3.7. Spălarea solului

Spălarea solului a fost propusă cu scopul de a elimina sporii și conidiile speciilor care sporulează abundent și a putea izola astfel ciupercile aflate sub formă de micelii legate de particulele de sol, speciile care cresc încet, sau cele care se găsesc în interiorul particulelor organice (Parkinson & al., 1971). Cea mai simplă metodă de spălare (Watson, 1960) constă în introducerea unui gram de sol într-un flacon care conține 200 ml apă sterilă, agitare, înclinarea flaconului la 45° timp de un minut pentru depunerea particulelor, decantarea apei și înlocuirea cu apă proaspătă, sterilă. Se repetă această operațiune de mai multe ori și în final particulele de sol rămase se dispersează în apă sterilă și se inoculează pe mediu, procedînd ca în cazul metodei diluțiilor.

Pentru obținerea unei spălări mai eficiente și rapide s-au propus mai multe aparate care, în principiu, se compun dintr-un recipient din sticlă organică, material plastic sau metal inoxidabil, prevăzut cu site și orificii pentru accesul și eliminarea apei.

Proba de sol se așază pe sita superioară, care are rețeaua cu cele mai mari ochiuri. Se introduce apă sterilă și se agită solul cu ajutorul aerului comprimat, steril. După două minute de agitare se elimină apa și se înlocuiește cu alta. Se repetă spălarea de 30—40 ori. Apa de spălare poate fi eliminată sau colectată și testată pentru prezența ciupercilor.

Particulele de sol rămase pe site se transferă într-un vas Petri, prin spălare cu apă sterilă, se deshidratează pe hîrtie de filtru sterilă și se pun apoi pe suprafața mediului de cultură, în plăci Petri, procedîndu-se ca la metoda dispersiei particulelor de sol („soil plate") (Parkinson & al., 1971). Pentru evitarea contaminării în timpul spălării, aparatele sînt prevăzute cu dispozitive de filtrare a aerului care pătrunde datorită depresiunii create de evacuarea apei din aparat. La aparatele mai perfecționate spălarea se face în flux continuu de apă, astfel că acest neajuns este înlăturat.

Diferitele tipuri de aparate pentru spălarea solului, mai mult sau mai puțin perfecționate, au fost descrise de Parkinson & Williams

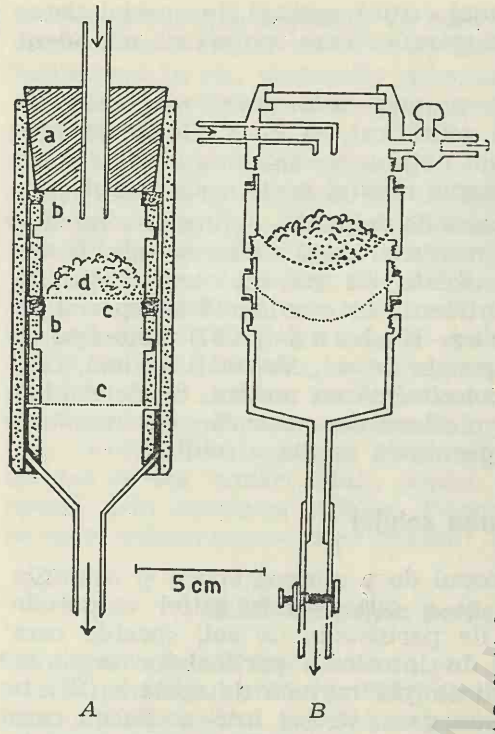


Fig. 10 — Aparate pentru spălarea solului în vederea izolării ciupercilor: *A* — confecționat din material plastic ; *a* — dop ; *b* — garnituri ; *c* — site cu rețea de 1,5 și 0,6 mm ; *d* — proba de sol. *B* — confecționat din metal (după Gams & Domsch, 1967)

(1961); Williams & al. (1965); Hering (1966), Gams & Domsch (1967) (fig. 10) și Bissett & Widden (1972).

Harley & Waid (1955) au propus un aparat și o metodă pentru izolarea, prin spălare, a ciupercilor din solul de pe rădăcini și resturi de frunze.

2.3.8. Metoda capcanelor

Metoda capcanelor se bazează pe fenomenul „succesiunilor ecologice heterotrofe" pe un anumit substrat (Payen, 1965) și permite izolarea selectivă a anumitor grupe de ciuperci, sau chiar a unei singure specii. O probă de sol se pune într-un vas Petri adînc, sterilizat, și se adaugă apă sterilă pînă cînd solul este acoperit de un strat de lichid. Se așază în apă diferite capcane constituite fie din substanțe organice moarte : celofan, frunze fierte de graminee, polen de pin, semințe de cînepă fierte, părți chitinoase de la insecte sau creveți, aripi de insecte, păr degresat, piele de șarpe etc., fie din substanțe organice vii : semințe, rădăcini, tuberculi, bulbi, fructe, tulpini, ramuri, frunze, ciuperci etc.

Se incubează cel puțin o lună și se examinează periodic pentru izolarea ciupercilor care colonizează pe rînd „capcanele".

Izolarea, cu această metodă, a ciupercilor celulozolitice este descrisă de Tribe (1957; 1960), Gams (1960), Griffiths & Jones (1963), a celor kerationolitice de Honeycutt (1948), Griffin (1960), Pugh & Mathison (1962), Stockdale (1971), a celor chitinolitice de Karling (1945), Veldkamp (1955), a ciupercilor parafinolitice de Rynearson & Peterson (1965), iar a dermatofiților de Vanbreuseghem (1952) și Stockdale (1971).

Plantele unor specii sensibile, cultivate într-un sol suspectat de prezența unor ciuperci fitopatogene, vor fi infectate și vor servi astfel drept capcane pentru izolarea acestor ciuperci.

Metoda capcanelor este folosită foarte frecvent pentru izolarea din sol a ciupercilor fitopatogene. O sinteză a principalelor lucrări referitoare la acest subiect este făcută de Payen (1965).

2.3.9. Alte metode

A. **Deshidratarea** într-un exsicator cu $CaCl_2$, timp de 3 zile, sau, pentru solurile nisipoase, păstrarea în termostat la 45° timp de 4—24 ore, produce inactivarea parțială a miceliilor și favorizează izolarea formelor sporifere (McLennan, 1928). Warcup (1960) a demonstrat că și sporii sînt afectați de acest tratament.

B. **Sterilizarea parțială** a solului prin încălzire la 100°, cu vapori, timp de 2—10 minute, favorizează izolarea *Ascomycetelor* care, în mod obișnuit, sînt eliminate datorită ciupercilor cu creștere rapidă din genurile *Mucor, Absidia, Zygorrhynchus* și *Trichoderma* (Warcup, 1951). Warcup & Baker (1963) au propus încălzirea, pe o baie de apă la 60°, timp de 30 minute, iar Barron (1971) la 50—90° timp de 2—10 minute, a unei suspensii de sol care se inoculează apoi pe mediu, procedîndu-se ca la metoda diluțiilor.

C. **Folosirea substanțelor chimice.** Wensley (1953), Warcup (1952) și Evans (1955) au arătat că cloropicrina, formalina și sulfura de carbon în anumite doze pot inactiva, selectiv, majoritatea ciupercilor din sol.

D. **Centrifugarea** (Ohms, 1957 ; Paden, 1967). Zece grame de sol cernut se amestecă cu 100 ml apă, se agită și se lasă 30 secunde pentru depunerea particulelor grele, care se elimină. Operația se repetă de 4 ori. Supernatantul se centrifughează 5 minute la 500 r.p.m. Supernatantul se elimină și depozitul se resuspendă în 20 ml apă sterilă, distilată. Suspensia obținută se centrifughează în gradient de densitate unde sporii rămîn în supernatant. Metoda este recomandată pentru izolarea sporilor de *Ascomycetes.* Barron (1969) folosind un procedeu de centrifugare simplificat a reușit să izoleze specii de *Hyphomycete* nematodofage.

2.3.10. Izolarea ciupercilor antagoniste

Izolarea ciupercilor antagoniste din sol este laborioasă și se face în mod obișnuit în două etape care cuprind izolarea ciupercilor și testarea pentru alegerea celor cu activitate antagonistă. Următoarea metodă (Parkinson & al. 1971), combină cele două etape, cu reducerea substanțială a timpului : Se selecționează microorganismul test (bacterii Gram-negative sau Gram-pozitive, actinomicete, ciuperci etc.). Se alege un mediu de cultură care să fie favorabil atît creșterii microorganismului test cît și ciupercilor și, de asemenea, să fie limpede. Înainte de solidificare, la temperatura de 45°, se inoculează mediul cu microorganismul test, se agită pentru omogenizare și se toarnă cantități standard în vase Petri. Suspensia de sol obținută prin metoda diluțiilor (vezi pag. 30) se însămînțează pe mediu printr-unul din următoarele procedee : În cazul că microorganismul test crește destul de repede se pipetează suspensia de sol în mediul inoculat cu acesta, înainte de turnarea în vase Petri. Dacă microorganismul test are creștere înceată atunci, după aproximativ 12 ore de la turnare în vasele Petri, se pipetează suspensia de sol la suprafața mediului și se distribuie în strat subțire cu o baghetă de sticlă, sau se amestecă suspensia cu o cantitate de agar și se toarnă, ca un nou strat de mediu, pe suprafața celui inoculat cu microorganismul test. După o perioadă de incubație se izolează, în culturi pure, coloniile care sînt înconjurate de

o zonă clară unde microorganismul test a fost inhibat sau inactivat. După Huber & Watson (1966) metodele prin care se separă organismul test de antagonist pot influența rezultatele obținute. Mediile folosite pot constitui o altă sursă de erori deoarece pe unele activitatea antagonistă se poate manifesta iar pe altele nu.

2.4. Izolarea ciupercilor acvatice

Nu toate ciupercile care se află în apă sînt acvatice. Unele dintre ele sînt de origine terestră iar altele doar se dezvoltă pe substraturi imersate în apă. Majoritatea ciupercilor acvatice fac parte din *Mastigomycotina, Ascomycotina* și *Hyphomycetes.*

Există multe metode de izolare a acestor ciuperci din apele dulci, din apa de mare sau apele poluate și cele mai importante sînt descrise în articolul de sinteză al lui Jones (1971). Metodele de izolare a ciupercilor din apa de mare sînt indicate și de Johnson & Sparrow (1961).

2.4.1. Izolarea ciupercilor din apele dulci

A. Metoda capcanelor. Probele de apă trebuie colectate în sticle sterile și folosite în maximum 24 ore de la colectare. Drept capcane se folosesc insecte ca *Musca domestica* sau *Drosophila,* păr uman, semințe de cînepă sau frunze fierte de graminee, celofan sterilizat, grăunciori de polen de conifere etc. Vasele Petri, sterile, se umplu cu apă distilată (obținută în recipiente de sticlă) și sterilizată. Se adaugă cîțiva ml din proba de analizat și materialul folosit drept capcană. Se incubează și se examinează între zilele 3—14. Izolarea se face fie direct, cu acul de însămînțat, prin desprinderea sporilor sau a miceliilor care se dezvoltă pe materialele-capcană și transferarea lor pe mediu de cultură, fie prin trecerea capcanelor, după ce au fost colonizate de ciuperci, pe medii în vase Petri, urmînd ca, după ce coloniile se dezvoltă pe mediu, să se facă izolarea diferitelor specii. Această metodă este foarte indicată pentru izolarea *„Phycomycetelor"* (Jones, 1971).

Pe teren procedeul este următorul : Se pun capcanele (mere verzi, pere, tomate, struguri, prune, fructe de măcieș, boabe de porumb, fructe de *Crataegus* etc.) în coșulețe din sîrmă galvanizată sau din material plastic, prevăzute cu capac. Se leagă coșulețul cu un fir de nylon și se cufundă în apă curgătoare sau de lac, pentru o perioadă de 1—5 săptămîni. După acest interval se scoate din apă, se spală capcanele cu apă sterilă și se trec, în laborator, din nou în apă de rîu sau de lac, proaspătă, la care s-au adăugat și capcane proaspete. Willoughby (1959) folosește hîrtia de ziar și celofanul drept capcane pentru izolarea *Chytridialelor* din lacuri iar Perrot (1960) ramuri de stejar, ulm, frasin, mesteacăn, paltin, anin și larice, imersate timp de 4 săptămîni.

Jones & Oliver (1964) propun următoarea metodă pentru izolarea *Ascomycetelor* și *Hyphomycetelor* din apă : Se scufundă, prin lestare, blocuri din lemn de tei, pin, fag etc., de aproximativ 20 × 2 cm, sterilizate în prealabil cu oxid de propilen. Blocurile se așază singure, în perechi, sau mai multe la un loc, și în acest caz se montează astfel încît suprafețele lor să nu se atingă. Blocurile se pot imersa parțial sau total,

iar adîncimea și timpul de imersare depind de scopul experiențelor și de temperatura apei. Cu cît apa este mai caldă timpul de imersare va fi mai scurt. La recuperare blocurile se pun fiecare separat în pungi de polietilenă sterile, se transportă și se examinează imediat în laborator. Incubarea se face în cutii sterile din material plastic în care blocurile se așază pe suporți astfel încît apa de pe suprafața lor să fie drenată, ceea ce are ca efect stimularea sporulării ciupercilor neperfecte ca și formarea de peritecii la *Ascomycetes*. Incubarea durează pînă la 15 săptămîni și periodic trebuie adăugată apă sterilă pentru menținerea umidității.

Izolarea ciupercilor de pe blocuri se poate face direct, prin detașarea sporilor cu un ac de însămînțat sau, în cazul ciupercilor lignicole, prin îndepărtarea stratului superficial și detașarea, în condiții sterile, a unui fragment din lemn, care se inoculează pe mediu nutritiv.

B. De pe frunzele căzute și putrezite, din rîuri sau bălți, se pot izola, mai ales în timpul toamnei și iernii, numeroase ciuperci neperfecte, în special *Hyphomycetes*, în felul următor : Se colectează frunzele în pungi de polietilenă și, în laborator, se spală cu apă distilată, sterilă. Se pun în vase Petri cu apă sterilă și după două zile ciupercile sporulează abundent. Conidiile de dimensiuni mari se detașează cu un ac de însămînțat iar cele mici se aspiră cu o pipetă Pasteur și se transferă pe un mediu adecvat la care s-au adăugat antibiotice (J o n e s, 1971). *Hyphomycetele* tipic acvatice nu sporulează decît dacă se pun fragmente dintr-o cultură veche de 3—4 săptămîni în apă și se aerează cu un curent continuu de aer comprimat.

C. Ciupercile de pe resturile organice din apă se pot izola, după P a r k (1972), prin următoarele metode : Se pune materialul în vas Petri sterilizat, în 15—20 ml dintr-un amestec steril de apă de baltă și apă distilată. Se incubează la temperatura camerei sau la 12° timp de 2—3 săptămîni și ciupercile se izolează fie direct de pe materialul organic fie de pe semințele de *Brassica* folosite drept capcane. Izolarea se poate face și prin însămînțarea particulelor colectate, pe mediu cu roz bengal și aureomicină, sau prin fragmentarea prealabilă a materialului colectat într-un mixer (1 g material la 20 ml apă sterilă) obținerea unei diluții (greutate uscată/volum) de 1/100 000 sau 1/700 000 și însămînțarea suspensiei obținute.

D. În spuma de la suprafața apelor se află multe *Hyphomycetes* (P r i c e & T a l b o t, 1966 ; C o o k e, 1963) dintre care unele cresc și se reproduc în aceste condiții, în timp ce altele sînt de origine terestră (E l l i s, 1949 ; H u d s o n & S u t t o n, 1964). Spuma de la suprafața rîurilor, bălților, lacurilor, se poate colecta cu ajutorul unei strecurători, așa cum se procedează la îndepărtarea spumei de la supă, și se toarnă apoi în flacoane de sticlă sterile. Izolările trebuie făcute în primele 24 ore de la colectare. Se diluează lichidul cu apă distilată, sterilă, și cîte un ml din soluția obținută se distribuie la suprafața mediului cu făină de porumb-agar sau celuloză-agar, la care s-au adăugat bactericide. Conidiile care germinează se transferă pe mediu proaspăt.

E. Filtrarea (M i l l e r, 1967). Se filtrează apa printr-un disc de filtru „millipore" cu diametrul porilor de 0,8, 1,2 și 3 μm. Se colectează reziduul de pe discul filtrului, se resuspendă în 5 ml apă și această soluție

se distribuie pe suprafața mediului: agar 30 g; glucoză 0,005 g; peptonă 0,05 g ; apă distilată 1 000 ml, la care se adaugă antibiotice.

Pentru izolarea levurilor, Fell & van Uden (1963) filtrează apa prin membrane „millipore" și pun apoi membrana în vase Petri, pe suprafața mediului : glucoză 2% ; peptonă 1% ; extract drojdii 0,5% ; agar 2% ; apă de mare 1 000 ml, cu pH ajustat la 4,5 cu acid lactic. Creșterea bacteriilor este împiedicată prin adăugarea de 10 mg clorhidrat de tetraciclină, 2 mg cloramfenicol și 2 mg sulfat de streptomicină.

După Jones (1971) tehnica filtrării este greoaie și durează prea mult iar Ulken & Sparrow (1968) au constatat că, pentru numărarea zoosporilor din ape de lac, este mai bună metoda capcanelor.

2.4.2. Izolarea ciupercilor din apele poluate

Ciupercile, împreună cu alte organisme, participă la descompunerea materiilor organice din apele poluate cu reziduuri industriale, menajere sau de altă proveniență, contribuind în acest fel la purificarea lor. Metodele de izolare a ciupercilor din acest mediu au fost inițiate de Cooke (1954), sînt descrise de Cooke (1963) și reluate de Jones (1971). Procedeele descrise mai jos se bazează pe ultimele două lucrări.

Folosind tehnicile obișnuite în hidrobiologie se colectează probe de apă, de sedimente de pe fundul albiei, sau din solul umed de la marginea rîurilor. Probele se pun în flacoane din material plastic sau sticlă, se spală bine resturile scurse la exteriorul flacoanelor, iar capacele nu se închid complet.

În laborator probele se diluează în felul următor : apa poluată, obișnuită, 1 : 10 ; apa de canal, menajeră, bogată în resturi, 1 : 100 ; nămolurile cu 4—6% substanță uscată, 1 : 1000 ; probele care conțin puțină apă și multă materie organică, pînă la 1 : 10000. În general probele se diluează la început 1 : 10, se agită mecanic timp de 30 minute, după care 5 ml din această soluție se pune în alt flacon și se prepară o soluție 1 : 100 care se agită manual. Se pot face diluții în continuare pînă se obțin, prin inoculare pe mediu, maximum 50 colonii la o placă Petri. Cel mai potrivit mediu pentru izolarea acestor ciuperci este neopeptonă-roz bengal-aureomicină-agar (nr. 139).

Pentru inoculare, Cooke (1963) recomandă următoarea tehnică : Se topește mediul în 5 eprubete, se adaugă 0,05 ml soluție de aureomicină și un ml din proba de analizat. Se toarnă într-un vas Petri și se rotește pentru dispersarea inoculului în mediu. Plăcile inoculate se păstrează la temperatura camerei, la lumină (după Pady & al. 1960 și Ottow 1972, expunerea la lumină a mediilor care conțin roz bengal este contraindicată) timp de o săptămînă, după care se numără coloniile și se pot face reizolări pentru identificarea speciilor. Prin acest procedeu se izolează ciupercile din diferite grupe sistematice, dar, în special, cele din clasa *Hyphomycetes*. Pentru izolarea ciupercilor din grupa *„Phycomycetes"* se folosește metoda capcanelor, utilizînd drept capcane semințele de cînepă (vezi p. 32), pentru ciupercile keratinofilice capcane din păr, stofă de lînă sau piele, iar ciupercile celulozolitice se pot izola prin inocularea probelor pe mediul celuloză-asparagină-agar (nr. 36).

Izolarea ciupercilor din filtrele de scurgere se face prin introducerea unor lame microscopice în filtre. După un interval lamele se ridică și se pun pe suprafața mediului, în vase Petri. Dacă depozitul este abun-

dent, atunci se răzuie materialul depus pe o faţă a lamei, în 20 ml apă distilată, se adaugă 80 ml apă distilată şi se agită 10—30 secunde, cu un agitator magnetic, într-un flacon Erlenmeyer. Din această suspensie omogenizată se fac diluţii succesive care se inoculează pe mediu.
Izolarea levurilor, foarte active în apele poluate, este descrisă pe larg de Jones (1971).

2.5. Izolarea ciupercilor zoopatogene

Multe ciuperci zoopatogene se află în aer, sol, sau pe diferite substraturi, de pe care se pot izola prin metode specifice acestora. Izolarea ciupercilor zoopatogene de pe substratul tipic, animal, se face prin detaşarea unor fragmente din organele infestate, sau obţinerea de micelii sau spori, şi însămînţarea lor pe medii de cultură. Mediul cel mai folosit este Sabouraud (nr. 173), la care se adaugă cloramfenicol 0,05 mg/ml sau actidionă 0,5 mg/ml. În unele cazuri, mai ales pentru identificare, este indicată folosirea mediului malţ-agar.
Metodele de izolare a ciupercilor zoopatogene sînt tratate pe larg de Stockdale (1971) şi Buckley (1971). În cele ce urmează sînt descrise numai metodele principale, specifice.

A. **Secreţii** din leziuni, sau puroi, spută, urină, lichid cefalorahidian, sînge etc., se însămînţează pe mediu. După dezvoltarea coloniilor se transferă hife de la marginea acestora pe mediu proaspăt. Dacă însămînţarea nu se face imediat după colectare probele pot fi păstrate în frigider.

B. **Piele.** Se tamponează pielea cu alcool 70% şi apoi cu un bisturiu steril se răzuie suprafaţa leziunii. Fragmentele obţinute, colectate într-un vas Petri steril, se însămînţează pe mediu. O altă metodă constă în presarea pe leziune a unei benzi de celofan adeziv, decuparea benzii cu un bisturiu steril şi însămînţarea fragmentelor obţinute pe mediu de cultură. Folosirea benzilor adezive de celofan sau de material plastic, în special pentru examinarea dermatofiţilor, este descrisă pe larg de Stockdale (1971).

C. **Unghii.** După sterilizarea cu alcool se taie cu un bisturiu steril sau o lamă fragmente mici din zona afectată, care să cuprindă atît stratul extern cît şi cel intern al unghiei. Fragmentele se pun pe mediu.

D. **Păr.** Metodele diferă în funcţie de ciuperca implicată. Unele ciuperci produc noduli pe firele de păr şi în acest caz firele se tund şi se pun pe medii de cultură. În cazul ciupercilor care atacă întîi rădăcina este importantă obţinerea acestora deoarece, de obicei, firul de păr se rupe la nivelul pielii. În acest scop pielea se răzuie cu un bisturiu steril şi apoi perii rupţi se smulg cu o pensă.
Pentru ciupercile care nu invadează ţesuturile ci rămîn la suprafaţa firelor se foloseşte metoda „periilor pentru păr" (Mackenzie, 1963). În funcţie de mărimea suprafeţei care trebuie analizată se folosesc periuţe de dinţi, de unghii, de păr, sau perii speciale pentru masajul pielii capului. Periile se trec de mai multe ori peste zona afectată şi apoi se presează pe suprafaţa mediului, într-un vas Petri. Periile se sterilizează la rece în soluţie de teepol 10% timp de 24 ore (Ive, 1966) sau în soluţie 0,1% clorohexidină, 30 minute (Conolle, 1965), după care se spală cu săpun în apă fierbinte, se usucă şi se împachetează în hîrtie pentru izolările următoare (Stockdale, 1971).

Mariat & Tapia (1966) folosesc bucăți de 6 × 6 cm dintr-un covor de lînă, nou, cu firul scurt. Se spală în apă de robinet timp de 48 ore, se clătește de cîteva ori în apă distilată, se usucă în etuvă, se împachetează în hîrtie și se sterilizează în autoclav 1 oră la 120°. Suprafața de cercetat se freacă bine și apoi fragmentul de covor este presat pe mediu.

2.6. Izolări monosporale

După izolarea unei ciuperci este necesar deseori ca ea să fie reizolată pornind de la un singur germen. În acest fel există garanția că este vorba de o singură specie și chiar de o singură sușă a speciei în cauză (Booth, 1971). Studiile de genetică sau fiziologie nu se pot concepe fără a avea siguranța purității culturii. Inoculul folosit în astfel de cercetări trebuie să fie controlat calitativ și cantitativ (Hildebrand, 1950). Pe de altă parte, culturile monosporale trebuie folosite numai atunci cînd este necesar. Astfel, izolarea unui singur spor nu garantează puritatea genetică, în cazul cînd ciuperca în cauză produce spori heterocariotici (Hooker, 1957).

În general, metodele de izolare monosporală folosite în micologie, au fost adaptate după tehnici similare din bacteriologie și, majoritatea, sînt descrise în lucrările de sinteză ale lui Dickinson (1933), Hildebrand (1938 ; 1950), Tuite (1969), Booth (1971).

În cele ce urmează se descriu doar metodele relativ simple, împărțite în două categorii : metode prin care se separă un spor dintr-o suspensie, sau din sporii aflați pe un suport solid și se transferă pe mediu de cultură, și metode în care un spor, o hifă, sau o colonie provenind dintr-un singur spor, se detașează, împreună cu o porțiune din mediul de cultură pe care se află, și se transferă pe mediu, în alt vas de cultură. Pentru uniformitate folosim termenul general de spor deși, de cele mai multe ori, elementele care se izolează și transferă sînt conidiile.

Este extrem de important ca în timpul transferării și imediat după ce sporul a fost depus pe mediul proaspăt, precum și la diferite intervale pînă se dezvoltă colonia, să se facă observații la microscop, pentru a avea garanția că s-a transferat un singur germen, că acesta nu a fost afectat în timpul manipulărilor și că nu au apărut contaminați.

2.6.1. Prepararea mediilor, a suspensiilor și însămînțarea

Mediul trebuie să fie limpede, consistent (2,5%—4% agar) și adecvat pentru creșterea ciupercii în studiu (Keitt, 1915 ; Leach, 1955). Pentru înlăturarea excesului de umiditate mediul se va turna în vasele Petri cu o zi înainte de folosire și cît mai rece, pentru a evita condensarea vaporilor de apă pe capacul vaselor (Tuite, 1969).

După Keitt (1915) trebuie obținută o densitate de 100—300 spori pe o placă Petri. Dacă sporii sînt prea mici vor fi lăsați să germineze pentru a fi observați mai ușor. Pentru obținerea unei diluții convenabile se pune la capătul unei lame sterile o picătură de mediu neagarizat și lîngă ea alte trei picături de apă sterilă. Cu o ansă, se transferă spori dintr-o cultură în prima picătură de mediu, se agită, apoi se transferă o cantitate mică din suspensia obținută în cea de a doua picătură, se agită, ș.a.m.d. pînă se obține o diluție suficient de slabă ca sporii să fie sepa-

rați (Dunn, 1924). Pentru însămînțare se pune o picătură de suspensie pe mediu, și apoi, cu ajutorul unei anse, a unei baghete de sticlă îndoită sau spatulă, se distribuie sporii pe suprafața mediului, avînd grijă ca să nu se producă zgîrierea acestuia (Tuite, 1969).

Gupta (1935) prepară, într-o eprubetă, o suspensie de spori în apă sterilă. Un tub de sticlă cu diametrul interior de 0,5—0,75 mm se efilează și se închide la ambele capete, se îndoaie la flacără în unghi de 30—45° și apoi unul din capete se introduce în eprubeta care conține suspensia. Prin lovire de fundul eprubetei se deschide unul din capete, iar în momentul cînd se sparge și capătul liber suspensia trece în tub și, prin atingere de suprafața mediului agarizat, se vor depune picături mici de suspensie care conțin de obicei cîte un spor. Transferul sporilor se face prin folosirea unor dispozitive descrise la subcapitolul 2.6.3.

Kienholz (1937), confecționează, din sticlă, o ansă cu o lungime totală de 7,5—10 cm, avînd partea terminală și bucla de grosimea unui fir de păr. Cu această ansă se transferă picături mici dintr-o suspensie, pe mediu, în plăci Petri, în locuri marcate în prealabil prin cercuri. Se examinează sub microscop și se transferă, prin metoda Keitt (1915), porțiunile de agar pe care se află picături conținînd cîte un singur spor.

2.6.2. Izolarea și transferul sporilor „fără mediu"

A. **Izolare cu tuburi capilare** (Edgerton, 1914). Se rotește în afară rama port-filtru a condensorului de la un microscop prevăzut cu astfel de ramă și se fixează în ea un dop de plută. Cu ajutorul unei cleme se montează pe dop un tub de sticlă cu diametrul interior de 2 mm, închis la un capăt și efilat la celălalt. Se aduce capătul tubului în centrul imaginii. Pe platina microscopului se așază o lamă microscopică, sterilă, pe care se află o suspensie de spori. Se deplasează lama astfel încît un spor să fie adus în dreptul capătului tubului capilar. Cu ajutorul șurubului condensorului se coboară tubul capilar pînă la nivelul sporului. Se toarnă o picătură de eter pe capătul închis al tubului și, datorită depresiunii create, sporul va fi aspirat în capilar. Se ridică tubul tot cu ajutorul șurubului condensorului, apoi se scoate din dop și, prin încălzirea ușoară a capătului închis la un microarzător, se expulzează sporul pe o placă cu mediu proaspăt. Roberts (1923) propune un dispozitiv pentru fixarea mai sigură a tubului.

Dispozitivul descris de Nygaard (1949) (fig. 11) este atașat obiectivului microscopului iar aspirarea și ejectarea suspensiei care conține sporul se produce prin rotirea șurubului montat la capătul tubului capilar.

B. **Metoda acului și ansei.** *Metoda acului,* imaginată de Hanna (1924), este folosită în special pentru izolarea sporilor cu dimensiuni mari (20—30 μm).

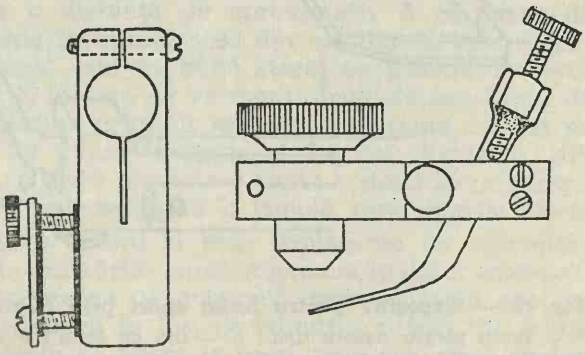


Fig. 11 — Dispozitiv pentru izolat spori, prin aspirare (după Nygaard, 1949)

Mecanismul prin care sporii aderă la vîrful acului nu este cunoscut. Se pare că umiditatea reziduală a sporului favorizează această aderență (Dickinson, 1933) și, de asemenea, umectarea vîrfului acului facilitează atașarea sporului. Se pun sporii pe o lamă microscopică sterilă, uscată, așezată pe platina microscopului. Vîrful acului de oțel (acele de cusut sînt foarte potrivite pentru acest scop) se aduce în dreptul sporului ales, care va adera și apoi este transferat pe mediu. Khair & al. (1966) folosesc ca substrat celofanul, în felul următor : Pe o lamă microscopică se pune un strat, de formă pătrată, de mediu apă de robinet-agar 4%. Deasupra mediului se așază celofan pentru dializă (produs de „Fischer Scientific Co"), care se fixează la capete cu bandă adezivă, iar pe celofan se depun sporii. Apropiind de un spor vîrful unui ac de cusut, se va produce aderarea sporului la ac, datorită probabil unei încărcări de electricitate statică (Guthrie, 1963), sporul putînd fi transferat în acest fel pe mediu.

Metoda acului a fost perfecționată de Hanna (1928) și Dickinson (1926 ; 1933).

Pe platina unui microscop se montează un dispozitiv ca cel din figura 12 sau altul mai complicat (Chilton & Wernham, 1940), care permite mișcarea pe verticală a unui ac de sticlă. Pe o lamă microscopică se fixează un cilindru de la o celulă Van Tieghem, prevăzut cu o deschidere laterală. Pe o lamelă se pune un strat subțire de mediu și pe acesta

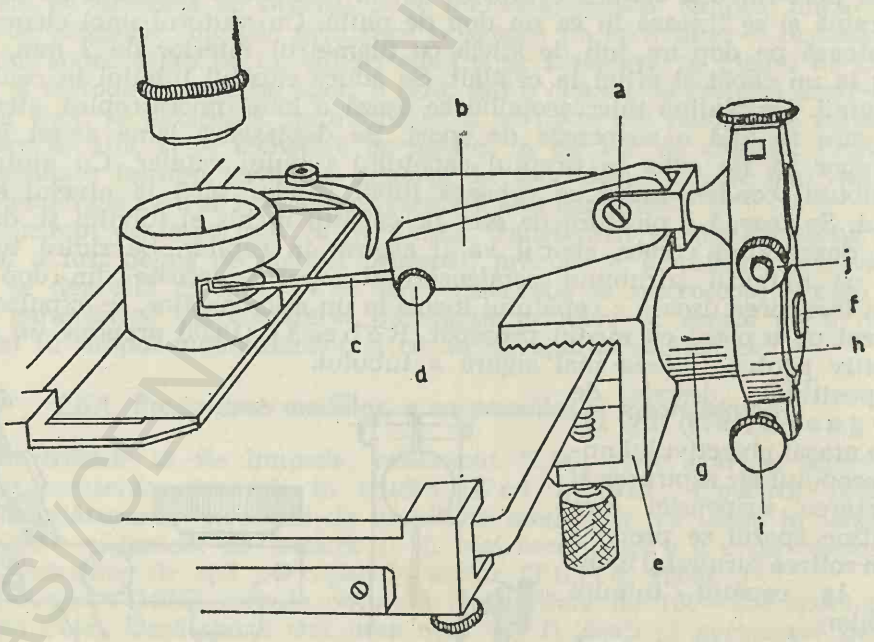


Fig. 12 — Dispozitiv pentru izolat spori prin metoda „acului" :

a — șurub pentru fixarea tijei ; *b* — tijă de lemn ; *c* — ac din sticlă ; *d* — șurub pentru fixarea acului ; *e* — clemă metalică pentru fixat dispozitivul la platina microscopului ; *f* — tijă metalică fixată de clemă ; *g* — cilindru de lemn ; *h* — inel metalic cu șurub de fixare (*i*) ; *j* — șurub pentru deplasarea acului pe verticală (după Hanna, 1928)

suspensia cu spori. Se așază lamela, cu suspensia în jos, pe celula Van Tieghem. Folosind șuruburile platinei microscopului se aduce un spor în dreptul acului de sticlă, apoi se ridică acul pînă în apropierea sporului astfel încît să se formeze un con de lichid care include sporul. Prin coborîrea acului sporul va rămîne în picătura de lichid de la vîrful acului. Se înlătură lamela și se așază alta pe care s-a depus o picătură de mediu. Se ridică din nou acul pînă la suprafața mediului și, printr-o mișcare laterală a lamei, se trece sporul pe mediul de pe noua lamelă. Se controlează lamela și apoi se așază deasupra altei celule Van Tieghem, sau mediul pe care se află sporul se transferă pe mediu proaspăt, în vas Petri sau eprubetă. Pentru reușita „extragerii" sporului din pelicula de lichid este foarte important ca partea superioară a acului să fie plană iar diametrul acestei suprafețe plane să depășească de cinci ori diametrul maxim al sporului (Dickinson, 1933).

Cosicov (1952) folosește o tehnică similară, mai simplă, deosebită doar prin faptul că acul, prevăzut cu un mîner, este sprijinit pe un suport fixat pe platina microscopului, ceea ce asigură o oarecare stabilitate în timpul manipulărilor, iar introducerea acului în celula van Tieghem se face prin interiorul unui tub de sticlă montat lateral pe aceasta.

Metoda ansei (Dunn, 1924). Se confecționează din sticlă o ansă cu diametrul interior al buclei de 1 × 0,5 mm, sau alte dimensiuni, în funcție de mărimea sporilor. Se pune pe binocular o lamă cu o suspensie slabă de spori și se atinge cu ansa suprafața suspensiei în dreptul unui spor. Prin ridicarea ansei, în pelicula de lichid din interiorul ei se află inclus și sporul. Se controlează ansa la microscop sau se depune picătura pe o lamă sterilă, se verifică, și apoi se transferă pe mediu. Dacă sporii sînt prea mici se poate atașa ansa la dispozitivul descris de Edgerton (1914) sau Roberts (1923). Staley & Lyon (1961) descriu o microforjă pentru confecționarea ansei din sticlă.

C. **Micromanipulatoarele** sînt în general aparate mai complicate, de mare precizie, dar scumpe, iar modul de utilizare diferă în funcție de marca produsului. Detalii asupra funcționării acestor aparate sînt date de El-Badry (1963).

Un micromanipulator improvizat, dar care poate fi folosit cu succes pentru orice fel de operații de izolare sau microchirurgie, a fost descris de Kavanagh (1963). Pe o placă de lemn se fixează cu ajutorul unor cleme două microscoape, la o distanță de aproximativ 5 cm unul de altul. La unul din microscoape (eventual scos din uz, dar la care mecanismul de mișcare pe verticală este în bună stare) se fixează în locul unui obiectiv un dop de plută, în care se va monta bagheta sau tubul de sticlă care poartă acul. Pe platina celuilalt microscop se pune o lamă pe care s-a fixat un cilindru de 2 cm înălțime și 1,5 cm diametru, din material plastic transparent, și care are într-o parte o deschidere pentru a permite accesul acului. Pe tub se așază o lamelă care poartă sporii. Prin deplasarea pe verticală a acului și prin deplasarea pe orizontală a lamei se pot asigura toate mișcările unui micromanipulator obișnuit. Pentru izolare, sporii se dispersează pe o lamelă, care se așază apoi cu suprafața pe care s-au depus sporii în jos, pe cilindrul suport. Se aduce un spor în dreptul acului, acesta va adera la ac și, prin coborîrea acului, sporul va fi desprins de pe lamelă. Se înlocuiește lamela cu alta pe care s-a depus o picătură de mediu și se transferă sporul pe mediu, prin

ridicarea acului. Acest tip de micromanipulator a fost folosit pentru secționarea capetelor hifelor, pentru izolarea celulelor la levuri sau chiar pentru izolarea unor spori de *Aspergillus*, cu un diametru de 3 μm.
Un micromanipulator similar este descris de Jauch (1965) iar Kemp (1970) prezintă un micromanipulator cu pîrghii, mai simplu decît modelele obișnuite.

2.6.3. Izolarea și transferul sporilor cu mediul suport

Izolarea și transferul sporilor, împreună cu mediul suport, se poate face cu microspatule de diferite forme, cu „izolatoare", sau prin alte metode.
A. Izolarea cu microspatule (Keitt, 1915). Se însămînțează suspensia de spori, pe un strat de mediu agarizat, gros de 1 mm, într-un vas Petri. Se răstoarnă placa, se examinează la microscop cu un măritor slab, se localizează și se marchează pe sticlă, cu tuș, poziția sporilor. Se confecționează din sîrmă de platină-iridium două microspatule. Cu prima (fig. 13 *A*), care are un diametru interior de 2 mm, se taie o porțiune cilindrică de mediu din jurul unui spor. Cu a doua (fig. 13 *B*) se transferă această porțiune de mediu, împreună cu sporul, într-o eprubetă sau în alt vas Petri din care, în prealabil, a fost detașat un fragment asemănător.
Ezekiel (1930) preferă însămînțarea germenilor în 4 sau 5 striuri paralele, pe care sporii se pot localiza și marca mai ușor, iar pentru transferul discului de agar care poartă sporul folosește o microspatulă ca cea din figura 13 *C*, confecționată din nichelină.
Cox (1952) nu mai marchează poziția sporilor pe spatele plăcii Petri ci, după ce demontează toate obiectivele de pe revolverul microscopului, în afară de cel de 10 x, aduce un spor în centrul cîmpului și apoi reduce diafragma de cîmp și cea a condensorului astfel încît sporul să se afle în centrul spotului luminos. După rotirea revolverului, tăierea agarului și transferul sporului se face ca în metoda lui Keitt (1915).
B. „Izolatoarele" sînt dispozitive care se pot monta pe revolverul microscopului, în locul unui obiectiv (Lambert, Keyworth) sau se fixează pe obiectiv (Georg, Leach, Darley, Skala). Se pot steriliza parțial sau total și au avantajul că nu mai este nevoie să se marcheze poziția sporilor. Diametrul interior al acestor izolatoare trebuie să fie aproximativ egal cu diametrul cîmpului microscopic, iar lungimea lor puțin mai mică decît distanța focală a obiectivelor.

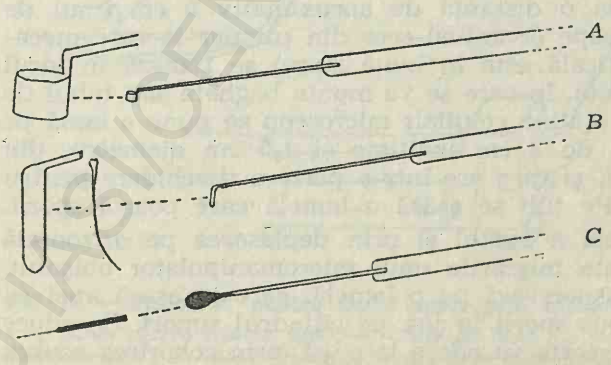


Fig. 13 — Microspatule pentru izolări monosporale. *A* și *B*, după Keitt, 1915 ; *C*, după Ezekiel, 1930

După însămînțarea plăcilor Petri cu o suspensie slabă de spori se lasă să se usuce suprafața mediului și, utilizînd un obiectiv slab, se localizează un spor izolat. Se rotește revolverul aducîndu-se în cîmp izolatorul, se coboară pentru

decuparea, din mediu, a unui disc în centrul căruia se află un spor. Discul astfel obținut se transferă cu ajutorul unui ac de însămînțat, sau prin ejectare, pe o placă cu mediu proaspăt. În cazul dispozitivelor fixate pe obiectiv nu mai este necesară rotirea revolverului, localizarea se face vizînd concomitent prin obiectiv și deschiderea izolatorului, care, în acest caz, trebuie să aibă diametrul egal sau mai mic decît cîmpul obiectivului.

Lambert (1939) utilizează un izolator confecționat din alamă (fig. 14 B) care permite tăierea discurilor cu diametru de 0,75 mm. Se coboară în mediu, se deplasează puțin lateral și prin ridicare se detașează și discul

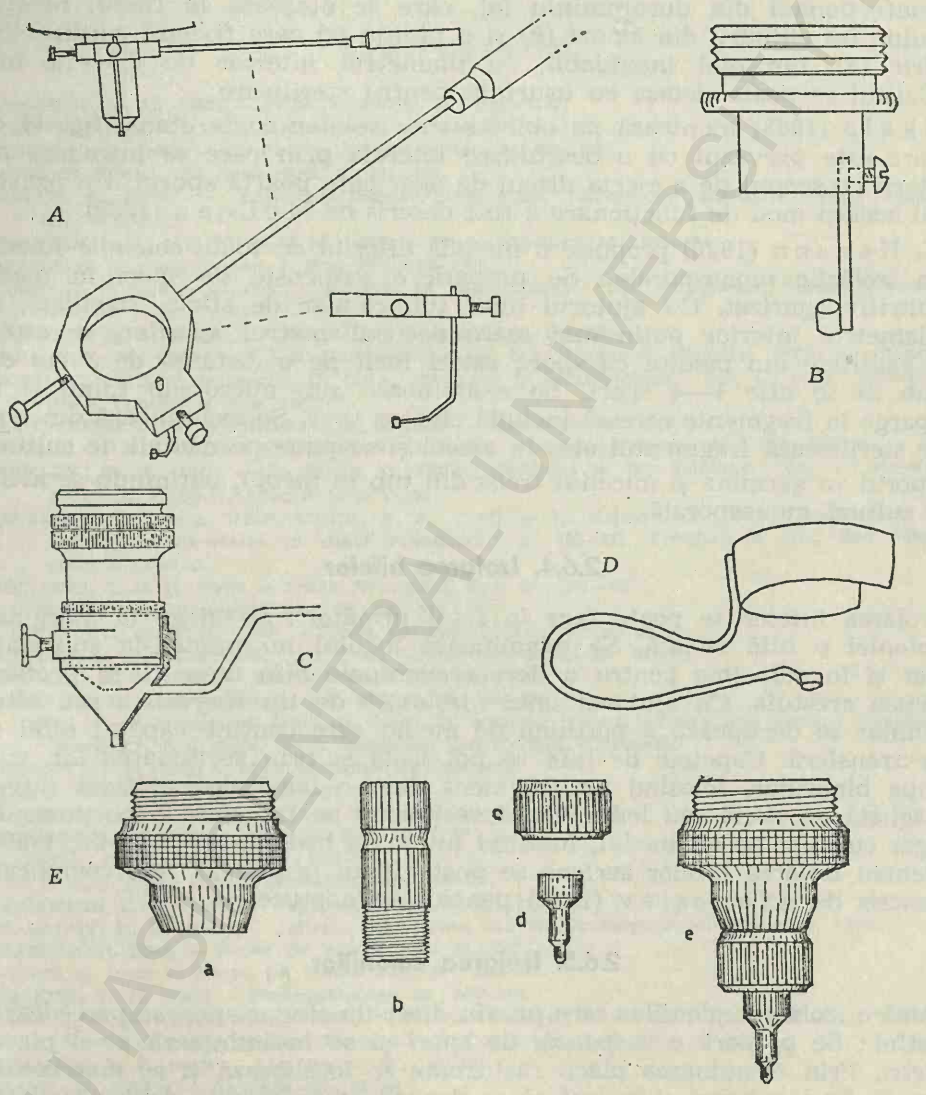


Fig. 14 — Tipuri de „izolatoare" :

A — după Leach, 1955 ; *B* — redesenat după Lambert, 1939 ; *C* — după Skala, 1958 ; *D* — după Darley din Tuite, 1969 ; *E* — redesenat după Keyworth, 1959

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care poartă sporul. Discul se transferă pe o altă placă Petri cu ajutorul unui ac de însămînțat, sau prin coborîrea dispozitivului. Un izolator similar este cel al lui Darley (fig. 14 *D*) descris de Tuite (1969). Georg (1947) propune utilizarea unui izolator din sticlă Pyrex care se poate steriliza la flacără și se fixează cu plastilină pe obiectiv.

Dispozitivul imaginat de Leach (1955) se poate atașa și desprinde ușor de pe obiectiv ceea ce facilitează sterilizarea. Tăietorul are un diametru de 1,5 mm (fig. 14 *A*).

Izolatorul lui Keyworth (1959) (fig. 14 *E*) constituie o perfecționare a dispozitivului descris de La Rue (1920). Este compus dintr-o parte confecționată din duraluminiu (*a*), care se atașează la filetul revolverului, un cilindru din alamă (*b*) și o piuliță (*c*) care fixează cuțitul cilindric (*d*), din oțel inoxidabil, cu diametrul interior de 0,5—1,5 mm. Cuțitul se poate detașa cu ușurință pentru sterilizare.

Skala (1958) montează pe obiectiv un izolator conic etanș (fig. 14 *C*), care este prevăzut cu o deschidere laterală prin care se introduce aer steril cu scopul de a ejecta discul de agar care poartă sporul. Un izolator cu același mod de funcționare a fost descris de McLean (1939).

C. Hansen (1926) propune o metodă diferită de toate celelalte folosite în izolările monosporale : Se prepară o suspensie de spori în mediu nutritiv agarizat. Cu ajutorul unui tub capilar de sticlă, sterilizat, cu diametrul interior puțin mai mare decît diametrul sporilor, se aspiră o cantitate din mediul cu spori, astfel încît pe o distanță de 3 cm din tub să se afle 1—4 spori. Se examinează sub microscop tubul și se sparge în fragmente care să includă cîte un spor. Se examinează din nou, se sterilizează fragmentul ales în alcool și se pune pe mediul de cultură. Sporul va germina și miceliul trece din tub în mediu, obținîndu-se astfel o cultură monosporală.

2.6.4. Izolarea hifelor

Izolarea hifelor se poate face în felul următor : Se alege la marginea coloniei o hifă izolată. Se examinează mediul nu numai la suprafață dar și în adîncime pentru a decela eventuale hife crescute în profunzimea acestuia. Cu ajutorul unui „izolator" de tip Keyworth sau altul similar se decupează o porțiune de mediu care conține capătul hifei și se transferă. Capetele de hife se pot izola și prin secționarea lor, sub lupa binocular, folosind un fragment dintr-o lamă de ras fixat într-o baghetă de sticlă sau lemn. După secționare se transferă o porțiune de agar cu hifa, pe alt mediu, folosind un ac de însămînțat (Tuite, 1969). Pentru izolarea hifelor aeriene se poate folosi procedeul, mai complicat, descris de Afanasiev (1937) pentru *Actinomycetes*.

2.6.5. Izolarea coloniilor

Pentru izolarea coloniilor care provin dintr-un singur spor, se procedează astfel : Se prepară o suspensie de spori și se însămînțează pe o placă Petri. Prin examinarea plăcii răsturnate se localizează și se marchează sporii. Se incubează și se lasă să se dezvolte pînă colonia devine vizibilă cu ochiul liber și apoi se transferă cu o microspatulă sau ac de însă-

 mînțat (Booth, 1971).

2.6.6. Microchirurgia

Microchirurgia cuprinde tehnici prin care se pot secţiona organe cum ar fi ascele sau bazidiile, în vederea separării şi izolării sporilor. Aceste tehnici se folosesc mai ales în cercetările de genetică şi sînt descrise de Dickinson (1933), Hildebrand (1950 ; 1960), Papazian (1950), Kemp & Bevan (1959) şi Cox & Bevan (1961).

Bibliografie

AFANASIEV, M. M. (1937) — *Phytopathology*, 27 : 1182—1183.
AGNIHOTHRUDU, V. (1962) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 16 : 235—242.
AKHTAR, C. M. (1967) — *W. Pakist. Jnl agric. Res.*, 5 : 129—137.
— (1968). *W. Pakist. Jnl agric. Res.*, 6 : 141—153.
ALTMAN, J. (1966) — „Phytopathological Techniques. Laboratory Manual." Pruett Press, Inc., Boulder.
ANDERSEN, A. L. & HUBER, D. M. (1965) — *Phytopathology*, 55 : 592—594.
BARRON, G. L. (1969) — *Can. J. Bot.*, 47 : 1899—1902.
— (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology." Vol. 4 : 405—427. Academic Press, London & New York.
BISSETT, J. & WIDDEN, P. (1972) — *Can. J. Microbiol.*, 18 : 1399—1404.
BOULLARD, B. (1967) — „Les Champignons du Sol. Écologie, Méthodes d'Étude." Rouen.
BOOTH, C. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology." Vol. 4 : 1—47. Academic Press, London & New York.
BRANDSBERG, J. W. & PIGGOTT, W. R. (1968) — *Mycologia*, 60 : 191—193.
BRUEHL, G. W., LAI, P. & HUISMAN, O. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 1035—1036.
BUCKLEY, H. R. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology." Vol. 4 : 461—478. Academic Press, London & New York.
CHANDLER, W. A. & KILPATRICK, R. A. (1967) — In Kelman, A. (Ed.). „Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology." p. 320—321. Freeman & Co., San Francisco & London.
CHESTERS, C. G. C. (1940) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 24 : 352—355.
— (1948) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 30 : 100—117.
— & THORNTON, R. H. (1956) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 39 : 301—313.
CHILTON, P. & WERNHAM, C. C. (1940) — *Phytopathology*, 30 : 695—697.
CONOLLE, M. D. (1965) — *Sabouraudia*, 4 : 45—48.
COOKE, W. B. (1954) — *Sewage Ind. Wastes*, 26 : 661—674.
— (1963) — „A laboratory guide to fungi in polluted waters, sewage and sewage treatment systems." U. S. Dept. Helth, Education and Welfare, Cincinnati.
COSICOV, C. V. (1952) — *Mikrobiologiya*, 21 : 449—452.
COX, R. S. (1952) — *Phytopathology*, 42 : 118.
— & BEVAN, E. A. (1961) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 44 : 239—242.
DICKINSON, S. (1926) — *Proc. R. Soc. Med.*, 19 : 1—4
— (1933) — *Phytopathology*, 23 : 357—367.
DUNN, M. S. (1924) — *Phytopathology*, 14 : 338—340.
EDGERTON, C. W. (1914) — *Phytopathology*, 4 : 115—117.
EL-BADRY, H. M. (1963) — „Micromanipulators and Micromanipulation." Springer, Viena.
ELLIS, M. B. (1949) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 32 : 246—251.
EVANS, E. (1955) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 38 : 335—346.
EZEKIEL, W. N. (1930) — *Phytopathology*, 20 : 583—586.
FELL, J. W. & UDEN, N. van (1963) — In Oppenheimer, C. H. (Ed.). „Symposium on Marine Microbiology." p. 329—340. Thomas Publ. Co., Springfield.
FLANNIGAN, B. (1973) — *Lab. Pract.*, 22 : 530—531.
GAMS, W. (1959 *a*) — *Sydowia*, 13 : 87—94.
— (1959*b*) — *Annls sci. Univ. Besançon*, Ser. 2 (3) : 93—94.
— (1960) — *Sydowia*, 14 : 295—307.
— & DOMSCH, K. H. (1967) — *Arch. Mikrobiol.*, 58 : 134—144.

GEORG, L. K. (1947) — *Mycologia*, 39 : 363—371.
GOCHENAUR, S. E. (1965) — *Mycologia*, 56 : 921—923.
GRANT, C. & SAVORY, J. G. (1968) — „Methods for Isolation and Identification of Fungi on Wood." Forest. Prod. Res. Lab., Aylesbury.
GREAVES, H. & SAVORY, J. G. (1965) — *J. Inst. Wood. Sci.*, Nr. 15, Oct., 45—50.
GRIFFIN, D. M. (1960) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 43 : 583—596.
GRIFFITHS, E. & JONES, D. (1963) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 46 : 285—294.
GUPTA, D. D. (1935) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 19 : 154—156.
GUTHRIE, E. J. (1963) — *Robigo*, 14 : 3—4.
HANNA, W. F. (1924) — *Ann. Bot.*, 38 : 791—795.
— (1928) — *Phytopathology*, 18 : 1017—1021.
HANSEN, H. N. (1926 — *Phytopathology*, 16 : 763.
HARLEY, J. L. & WAID, J. S. (1955) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 38 : 104—118.
HENNEBERT, G. L. (1960) — *Annls Fédér. Spéléol. Belg.*, 1 : 3—13.
HERING, T. F. (1966) — *Pl. Soil*, 25 : 195—200.
HILDEBRAND, E. M. (1938) — *Bot. Rev.*, 4 : 627—664.
— (1950) — *Bot. Rev.*, 16 : 181—207.
— (1960) — *Bot. Rev.*, 26 : 277—330.
HONEYCUTT, M. B. (1948) — *J. Elisha Mitchell scient. Soc.*, 64 : 277—285.
HOOKER, A. L. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 460—468.
HORNBY, D. (1969) — *Jnl appl. Bact.*, 32 : 244—258.
HUBER, D. M. & WATSON, R. D. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 882.
HUDSON, H. J. & SUTTON, B. C. (1964) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 47 : 197—203.
IVE, F. A. (1966) — *Br. J. Derm.*, 78 : 219—221.
JAUCH, C. (1965) — *Revta Fac. Agron. Univ. B. Aires*, 16 : 131—141.
JOHNSON, L. F. & MANKA, K. (1961) — *Soil Sci.*, 92 : 79—84.
JOHNSON, T. W. & SPARROW, F. K. (1961) — „Fungi in Oceans and Estuaries." J. Cramer, Lehre.
JONES, E. B. G. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology." Vol. 4 : 335—365. Academic Press, London & New York.
— & OLIVER, A. C. (1964) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 47 : 45—48.
KARLING, J. S. (1945) — *Am. J. Bot.*, 32 : 362—369.
KAVANAGH, T. (1963) — *J. Dep. Agr. Eire*, 60 : 66—67.
KEITT, G. W. (1915) — *Phytopathology*, 5 : 266—269.
KEMP, R. F. O. (1970) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 55 : 493—496.
— & BEVAN, E. A. (1959) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 42 : 308—311.
KEYWORTH, W. G. (1951) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 34 : 291—292.
— (1959) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 42 : 53—54.
KHAIR, J., FLEISCHMANN, G. & DINOOR, A. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 346.
KIENHOLZ, J. R. (1937) — *Phytopathology*, 27 : 950—951.
KIRILENKO, T. S. (1973) — In Bilai, V. I. (Ed.). „Metodi experimentalnoi Mikologhii." p. 175—196. Naukova dumka, Kiev.
LAMBERT, E. B. (1939) — *Phytopathology*, 29 : 212—214.
LA RUE, C. D. (1920) — *Bot. Gaz.*, 70 : 319—320.
LA TOUCHE, C. J. (1948) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 31 : 281—284.
LEACH, C. M. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 405—407.
MACKENZIE, D. W. R. (1963) — *Br. med. J.*, 1 : 363—365.
McLEAN, R. C. (1939) — *Watson's micr. Rec.*, 46 : 3—4.
McLENNAN, E. (1923) — *Ann. appl. Biol.*, 15 : 95—109.
MALONE, J. P. & MUSKETT, A. E. (1964) — *Proc. int. Seed Test. Ass.*, 29 : 179—384.
MARIAT, F. & TAPIA, G. (1966) — *Annls Parasit. hum. comp.*, 41 : 627—634.
MARTINSON, C. & BAKER, R. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 619—621.
MILLER, C. E. (1967) — *Mycologia*, 59 : 524—527.
MOORE, M. B. & KOMMEDAHL, T. (1947) — *Phytopathology*, 37 : 6.
MOORE-LANDECKER, E. (1972) — „Fundamentals of the Fungi." Prentice Hall, Inc., Englewood.
MUELLER, K. E. & DURELL, L. W. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 243.
MUSKETT, A. E. &MALONE, J. P. (1956) — *Nature, Lond.*, 177 : 465—466.
NOBLE, M. (1968) — In „Plant Pathologist's Pocketbook." p. 174—178. Commonwealth Mycological Institute — Kew.
NYGAARD, G. (1949) — *Science, N. Y.*, 110 : 165—166.
OHMS, R. E. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 751—752.
OTTOW, J. C. G. (1972) — *Mycologia*, 64 : 304—315.
ÖNER, M. (1972) — *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, Abt. 2. 127 : 770—776.
PADEN, J. W. (1967) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 33 : 382—384.

PADY, S. M., KRAMER, C. L. & PATHAK, V. K. (1961). *Mycologia*, 52 : 347—350.
PAHARIA, K. D. & KOMMEDAHL, T. (1954) — *Phytopathology*, 44 : 502.
PAPAZIAN, H. P. (1950) — *Bot. Gaz.*, 112 : 139—140.
PARK, D. (1972) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58 : 281—290.
PARKINSON, D. (1957) — *Pédologie, Gand*, 7 : 146—154.
— GRAY, T. R. G. & WILLIAMS, S. T. (1971) — „Methods for Studying the Ecology of Soil Micro-organisms." Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh.
— & WILLIAMS, S. T. (1961) — *Pl. Soil.*, 13 : 347—355.
PAYEN, J. (1965) — *Bull École Natn. agron. Nancy*, 7 : 29—54.
PERROT, P. E. (1960) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 43 : 19—30.
PRICE, I. P. & TALBOT, P. H. B. (1966) — *Aust. J. Bot.*, 14 : 19—24.
PUGH, G. J. F. & MATHISON, G. E. (1962) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 45 : 567—572.
PUNITHALINGAM, E. (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology." Vol. 4 : 193—218. Academic Press, London & New York.
RAO, P. R. (1970) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 40 : 299—304.
RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. (1965) — „The genus *Aspergillus*." Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
RAPILLY, F. (1968) — „Les techniques de mycologie en pathologie végétale." *Annls Épiphyt.*, 19 (Nr. hors série) : 1—102.
RIKER, A. J. & RIKER, R. S. (1936) — „Introduction to Research on Plant Diseases." John S. Swift Co., St. Louis.
ROBERTS, J. W. (1923) — *Phytopathology*, 13 : 558—560.
RODRIGUEZ-KABANA, R. (1967) — *Pl. Soil*, 26 : 393—396.
RYNEARSON, T. T. & PETERSON, J. L. (1965) — *Mycologia*, 57 : 761—765.
SCHREURS, J. (1964) — *Neth. J. Pl. Path.*, 70 : 90—91.
SEWELL, G. W. F. (1956) — *Nature, Lond.*, 177 : 703.
SINGH, K. B. (1965) — *Nature, Lond.*, 206 : 1169—1170.
SKALA, J. (1958) — *Česká Mykol.*, 12 : 189—190.
STALEY, J. M. & LYON, H. (1961) — *Pl. Dis. Reptr* 45 : 312—313.
STOCKDALE, P. M. (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology." Vol. 4 : 429—460. Academic Press, London & New York.
STOVER, R. H. & WAITE, B. H. (1953) — *Phytopathology*, 43 : 700—701.
THORNTON, R. H. (1952) — *Research*, 5 : 190—191.
— (1958). —*Nature, Lond.*, 182 : 1690.
TRIBE, H. T. (1957) — In Williams, R. E. D. & Spicer, C. C. (ed.). „Microbial Ecology." p. 287—298. Cambridge University Press.
— (1960) — In Parkinson, D. & Waid, J. S. (Ed.). „The Ecology of Soil Fungi." p. 246—256. Liverpool University Press, Liverpool.
TUITE, J. (1969) — „Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria." Burgess Publ. Co., Minneapolis.
ULKEN, A. & SPARROW, F. K. (1968) — *Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, 11 : 83—88.
VANBREUSEGHEM, R. (1952) — *Annls Soc. belge Méd. trop.*, 32 : 173—178.
VELDKAMP, H. (1955) — *Meded. LandbHoogesch. Wageningen*, 55 : 127—174.
WAID, J. S. (1956) — *Nature, Lond.*, 178 : 1477—1478.
WAKSMAN, S. A. (1927) — „Principles of Soil Microbiology." Williams & Wilkins Co., Baltimore.
WARCUP, J. H. (1950) — *Nature, Lond.*, 166 : 117.
— (1951) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 34 : 515—518.
— (1952) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 35 : 248—262.
— (1955) — *Nature, Lond.*, 175 : 953—954.
— (1959) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 42 : 45—52.
— (1960) — In Parkinson, D. & Waid, J. S. (Ed.). „The Ecology of Soil Fungi." p. 3—21. Liverpool University Press, Liverpool.
— & BAKER, K. F. (1963) — *Nature, Lond.*, 197 : 1317—1318.
WATSON, R. D. (1960) — *Phytopathology*, 50 : 792—794.
WENSLEY, R. N. (1953) — *Can. J. Bot.*, 31 : 277—308.
WILHELM, S. (1956) — *Phytopathology*, 46 : 293—295.
WILLIAMS, S. T., PARKINSON, D. & BURGES, N. A. (1965) — *Pl. Soil*, 22 : 167—186.
WILLOUGHBY, L. G. (1959) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 42 : 67—71.
WOOD, F. A. & WILCOXON, R. D. (1960) — *Pl. Dis. Reptr*, 44 : 594.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul 3

Examinarea

Examinarea ciupercilor se face aproape întotdeauna în scopul identificării, sau pentru a cerceta relațiile dintre organismul fungic și substratul pe sau în care se află.

În toate cazurile trebuie făcut un examen macroscopic, preliminar, cu ochiul liber, lupa de mînă sau lupa binocular, pentru a observa caracterele superficiale ca: simptomele produse pe substratul organic viu (plante sau animale), forma, culoarea, tipul de fructificație etc. Pentru examenul microscopic, prin care se pot observa caracterele și structurile invizibile cu alte mijloace, este necesară prelevarea materialului, eventual secționarea, colorarea și montarea în preparate microscopice.

Este foarte important ca toate observațiile făcute în timpul examinării macro și microscopice să fie notate, și aceste note, împreună cu desenele, schițele și fotografiile, să fie păstrate la un loc cu exemplarul studiat, sau separat, dar într-un sistem care să permită regăsirea rapidă. Această condiție, deseori neglijată, este extrem de utilă, mai ales în cazul studiilor taxonomice.

Metodele de examinare diferă în funcție de substratul pe care se dezvoltă ciupercile, modul de creștere, de dimensiunile fructificațiilor, de grupa sistematică etc.

3.1. Examinarea ciupercilor microscopice

Ciupercile dezvoltate pe suprafața substratului (plante, resturi organice sau materii anorganice) se pot examina fie în laborator la lupa binocular, dacă substratul sau un fragment poate fi transportat, fie direct, pe teren, cu o lupă de mînă. Cu un bisturiu, ac de însămînțat sau ac spatulat, eventual umectate, se detașează prin zgîriere o parte din miceliu sau fructificații și se montează într-un preparat microscopic, în mediu lichid, respectînd indicațiile de la subcapitolul 3.5. Dacă ciuperca este strîns atașată substratului, sau fructificațiile sînt foarte sărace (caz frecvent la unele ciuperci parazite pe frunze), atunci, pentru obținerea unui preparat, este mai indicată utilizarea benzilor de celofan cu adeziv sau înglobarea în pelicule de acetat de celuloză.

Banda de celofan cu adeziv (Scotch-tape) (Butler & Mann, 1959; Lloyd, 1965). Se taie un fragment cu dimensiunile mai mici decît o lamelă microscopică. Banda se așază deasupra suprafeței de cercetat ținînd-o cu o pensă de un colț și se presează cu degetul. Fructificațiile sau miceliile se vor atașa de bandă. Se ridică de pe substrat și se pune cu partea încleiată în sus, pe o lamă, într-o picătură de lactofenol.

Pentru a evita răsucirea benzii se adaugă și deasupra o picătură de lactofenol, apoi se acoperă cu lamela și se examinează la microscop. Preparatele obținute în acest mod nu sînt permanente (Smith, 1971). Banda de celofan se încrețește după un timp și, așa cum am observat în preparatele făcute pentru examinarea ciupercilor dezvoltate pe suprafețele frescelor, lactofenolul pare să reacționeze cu adezivul, formînd nenumărate picături uleioase, care scad claritatea preparatului. Metoda este însă foarte bună pentru preparate provizorii, avînd avantajul că păstrează aproape neschimbat modul de aranjare a fructificațiilor. Artman (1969) a folosit această tehnică pentru studierea ecidiosporilor iar Stockdale (1971) descrie modul de utilizare a benzilor de celofan pentru examinarea ciupercilor care produc dermatomicoze.

Acetatul de celuloză („Necol mounts"). O picătură de soluție de acetat de celuloză în acetonă, cu vîscozitatea asemănătoare glicerinei, preparată în laborator (la soluția : 4 părți acetonă și o parte alcool diacetonic care conține 1% abietat de benzil și 1% triacetină, se adaugă acetat de celuloză pînă se obține consistența dorită), sau produsă sub denumirile de „Necol" și „Necoloidin", se depune pe suprafața substratului care poartă fructificațiile ciupercii. După evaporarea solventului (15—30 minute), pelicula care se formează și în care ciuperca a fost înglobată, se detașează cu un bisturiu sau o pensă și se montează în glicerină, lactofenol sau balsam de Canada. Acetatul de celuloză se poate îndepărta prin așezarea peliculei pe o lamă și pipetarea de acetonă. Pelicula se dizolvă și acetatul tinde să se deplaseze către periferia preparatului, de unde se înlătură cu hîrtie de filtru. Peste hifele și fructificațiile rămase pe lamă se pune o picătură de lactofenol, acid lactic sau balsam de Canada. Skerman (1946) folosește soluția : eter 75 ml, alcool etilic 25 ml, celoidină 10 g, iar Wenzl (1939) : celoidină 5—5,5% dizolvată într-un amestec din 1 parte alcool și 2 părți eter, la care se adaugă ulei de ricin 40%.

Această tehnică, excelentă în cazul ciupercilor cu fructificații fragile *(Hyphomycetes)* sau superficiale *(Meliolineae, Erysiphaceae, Microthyriaceae)* aparține lui Winter care a folosit celoidina și a fost descrisă de Gaillard în 1892 (Stevens 1916 a ; 1916 b). Ulterior a fost menționată, printre alții, de Ellis (1950), Bisby (1953), Ellis (1960), Hansford (1961), Dring (1971), iar Petersen (1956) o folosește pentru studierea pătrunderii tuburilor germinative ale uredosporilor, în țesuturi.

Ciupercile din țesuturile vegetale se pot pune în evidență prin montare în preparate integrale (3.4.2. C), prin secționarea și colorarea țesuturilor incluzionate (3.4.2. A), sau a țesuturilor neincluzionate (3.4.2. B.).

Examinarea ciupercilor din sol se poate face indirect, prin metodele descrise la capitolul izolare, și direct. Examinarea directă cuprinde mai multe tehnici ca : examinarea particulelor prin microscopie optică și electronică, examinarea profilelor de sol, secționarea solului, metode de contact a unor materiale cu solul, folosirea tuburilor capilare și a plaselor de nylon, examinarea interacțiunii dintre ciuperci și rădăcinile plantelor etc. Aceste metode sînt descrise pe larg în lucrările lui Boullard (1967), Parkinson & al. (1971) și Barron (1971).

Examinarea ciupercilor în culturi (vezi și 3.6.). Identificarea ciupercilor necesită aproape întotdeauna observarea modului de formare a conidiilor

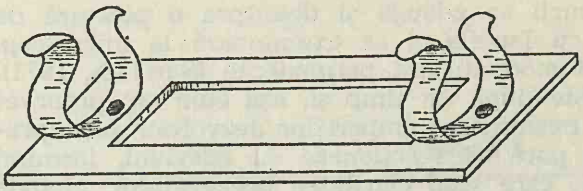


Fig. 15 — Dispozitiv pentru fixat eprubeta pe platina microscopului

sau a organelor de înmulțire sexuată. Examinarea se face sub lupa binoculară, cînd ciuperca este crescută în vase Petri, și cu microscopul în cazul ciupercilor cultivate în eprubete. În a doua situație se așază eprubeta pe platina microscopului și cu un obiectiv slab (10 x) se examinează zonele marginale ale culturii. Pentru fixarea eprubetei se poate folosi dispozitivul cu cleme descris de Benedek (1941), cel din plexiglas imaginat de Ioniță (1973) sau unul metalic (fig. 15), care se montează ca o lamă microscopică. Aceste metode, foarte utile pentru observarea conidiogenezei și a structurilor spațiale, nu permit totuși obținerea unor fotografii clare, deoarece ciuperca se află în planuri diferite. De asemenea nu este posibilă folosirea obiectivelor mai puternice, cu distanță focală mică. Pe de altă parte, prelevarea fragmentelor de ciuperci din cultură și montarea în preparate microscopice, duce aproape inevitabil la deranjarea structurilor morfologice ale fructificațiilor.

Aceste dificultăți pot fi eliminate prin folosirea metodei acetatului de celuloză („Necol") sau a benzilor de celofan adeziv („Scotch tape"), procedînd ca la analizarea ciupercilor care se dezvoltă la suprafața substratului (pag. 48—49).

Se cunosc două modificări ale tehnicii de utilizare a benzilor de celofan, recomandate special pentru examinarea culturilor : Endo (1966) folosește o bandă cu adeziv pe ambele părți, în felul următor : se pune o lamelă pe o lamă microscopică. Se lipește o porțiune de bandă pe lamelă. Se taie și se îndepărtează banda care depășește marginile lamelei. Se presează ușor lamela cu banda adezivă pe suprafața culturii. Se ridică și se depune peste o picătură de apă sau lactofenol, pe o lamă microscopică. Bretz & Berry (1964) pun 90 cm de bandă adezivă în 25 ml xilol. După ce substanța adezivă s-a dizolvat, se păstrează soluția obținută într-un flacon. O picătură de soluție se pune pe suprafața unei lamele, se așteaptă evaporarea xilolului și apoi lamela este presată pe cultura de analizat, după care se montează în lichid, pe o lamă.

După Smith (1971) examinarea culturilor trebuie făcută în vase Petri, la culturi în vîrstă de 5—7 zile, în funcție de ritmul de dezvoltare al speciei în cauză. Dacă se face prea devreme conidiile nu sînt încă formate iar prea tîrziu, în special la *Hyphomycetes*, nu se mai disting. Din culturi în vase Petri se pot obține direct preparate în felul următor (Sackston, 1954 ; Covert, 1956) :

Se alege o porțiune de la marginea coloniei și se taie un bloc de agar. Se așază pe o lamă și se ajustează pînă se obține un diametru cu 4—6 mm mai mic decît al lamelei. Se pune lamela deasupra, direct pe agar, sau se adaugă în prealabil o picătură de apă sau lichid de montare, eventual cu un colorant. Se verifică preparatul la microscop și se pun pe lamă bucăți de parafină care, prin încălzirea preparatului, se vor topi, ocupînd spațiul dintre lamă și lamelă, de jur împrejurul blocului de agar. Preparatele astfel montate dureaza 2—5 ani. Feder & Hutchins (1964)

descriu o metodă diferită doar prin folosirea de „Permount" Fischer, în loc de parafină.

O tehnică mai complexă este descrisă de Duddington & Dixon (1951). Se taie din cultură un bloc de agar de 4 mm diametru și se fixează 24 ore, sau mai mult, în amestecul : formalină 10 ml, acid acetic glacial 5 ml, apă distilată 85 ml. Se spală blocul pînă dispare mirosul de acid acetic și se lipește cu fructificațiile ciupercii în jos, pe o lamelă, cu ajutorul gelatinei. Se lasă să se deshidrateze agarul la temperatura de 35°, pînă începe să se încrețească. Ciuperca va rămîne fixată pe sticlă. Blocul de agar se taie cu o lamă cît mai aproape de lamelă și se îndepărtează. Materialul rămas pe lamelă se colorează cu hematoxilină Heidenhain, se deshidratează prin trecere în serie de alcooli, se clarifică cu ulei de terebentină și se montează în balsam de Canada.

Aubé & Pelletier (1969) obțin o „sporogramă" la *Verticillium*, prin așezarea unui fragment de cultură pe o lamă pentru 30 secunde și apoi montarea în lactofenol a conidiilor care aderă la lamă. În acest fel se păstrează aproape nemodificat modul de aranjare al conidiilor și celulelor conidiogene.

3.2. Examinarea ciupercilor macroscopice

Multe caractere trebuie notate în timpul și imediat după colectare. Procedeele de examinare diferă în funcție de grupul sistematic care se studiază și sînt descrise de Josserand (1952), Disbrey & Watling (1967), Watling (1968), Henderson & al. (1969), LaRue (1971).

3.3. Secționarea

În micologie, secționarea materialelor este necesară pentru studierea ciupercilor microscopice aflate în țesuturile vegetale, ori în scopul cercetării structurii morfologice a ciupercilor macroscopice. În general tehnicile folosite sînt cele proprii histologiei animale și vegetale și, din această cauză, nu se vor descrie decît cele mai uzuale procedee, indicîndu-se însă sursele bibliografice pentru celelalte.

Cel mai des se folosesc secțiunile de mînă, sau cele obținute cu microtomul cu congelare, din materiale proaspete sau deshidratate, conservate. Rehidratarea materialelor, în special în cazul ciupercilor parazite pe plante, se poate face prin imersie în soluție de KOH 3%, la 75°, timp de 20—30 minute și apoi spălare în apă 1—2 ore (Cunningham, 1969).

3.3.1. Secționarea materialelor neincluzionate

A. **Secțiuni „de mînă".** Materialele suficient de rigide și voluminoase (pețiolii și tulpinile de la unele plante ierboase) pot fi secționate direct, cu un brici sau o lamă. Dacă materialul nu este rigid (frunze, tulpini subțiri) atunci un fragment este introdus între două jumătăți ale unui cilindru de măduvă de soc, măduvă de floarea-soarelui sau chiar polistiren expandat folosit la ambalaje. Se leagă cele două jumătăți pentru ca materialul să rămînă fixat, sau se țin strîns cu mîna, și se taie cu un brici de secțiuni, lamă de ras, sau brici de ras cu lame detașabile (de exemplu

„Weck"). În tot timpul secționării materialul trebuie umectat cu apă sau, mai bine, cu o soluție slabă de săpun sau o soluție de gelatină 0,5% (Altman, 1966). Modul de susținere a materialului într-o mînă, și manevrarea briciului sau a lamei cu cealaltă, este descris în diferite lucrări dar, așa cum remarcă Sass (1951): „Pentru această operație instrucțiunile scrise au o mică valoare. Principalele cerințe sînt răbdarea, experiența și, probabil, o îndemînare inerentă". Secțiunile se detașează de pe lamă cu o pensulă fină și se trec într-o sticlă de ceas, în apă, după care urmează deshidratarea, colorarea și montarea în preparate microscopice.

Deoarece succesul acestui procedeu depinde în mare măsură de îndemînarea operatorului, s-au imaginat diferite procedee și s-au construit dispozitive care să asigure un control asupra grosimii secțiunilor obținute. Savile (1946) pune pe platina unei lupe binocular o lamă. Fragmentul de secționat este fixat de lamă prin apăsare cu un ac spatulat și cu un bisturiu taie secțiunile de-a lungul unei laturi a acului, procedînd ca în cazul tăierii legumelor în fragmente mici, la bucătărie. Operația se face sub lupă asigurînd în acest fel și selecționarea secțiunilor reușite. Hooker (1967) a construit un microtom rotativ al cărui cuțit este constituit dintr-o lamă de ras, iar Antoine (1965), un microtom special pentru secționarea ciupercilor cu ajutorul lamei de ras. Organele voluminoase sau incluse în măduvă de soc se pot secționa și cu un microtom de mînă, procedeu descris de Langeron (1949) și Gray (1958).

B. **Secționarea materialelor congelate.** Țesuturile fragile, ca și culturile pe mediu agarizat, pot fi secționate, după ce au fost congelate. Această operație se face cu un microtom special descris în lucrările lui Langeron (1949), Sass (1951), Policard & al., (1957) și Gray (1958), care asigură congelarea cu eter, CO_2 sub formă gazoasă sau solidă (zăpadă carbonică) sau cu un congelator electric.

Modul de lucru: se pun pe port obiectul microtomului și se îngheață pe rînd, cîteva straturi dintr-o soluție de gumă arabică, gelatină, sau agar. După ce stratul a ajuns la 2—3 mm grosime se așază deasupra materialul și se congelează treptat prin jeturi de gaz, adăugînd tot timpul în jurul fragmentului aceeași soluție. De altfel este bine ca materialul, mai ales dacă este deshidratat, să fie înmuiat pentru 24—48 ore înainte de secționare, în soluția care se va folosi în cursul congelării. După congelare se fixează grosimea la care se vor tăia secțiunile și se acționează manual cuțitul microtomului. Secțiunile se vor aduna pe suprafața superioară a lamei de unde se transferă cu o pensulă fină, într-o sticlă de ceas.

Farris (1968) înmoaie materialul în apă timp de 1/2—1 oră, apoi într-o soluție de mucilagii timp de o oră, după care secționează. Simms (1965) secționează corpurile fructifere de la ciupercile cărnoase cu lama, după ce au fost congelate în frigider, obținînd secțiuni de 50 μm grosime.

Knox (1970) descrie o tehnică de secționare a țesuturilor vegetale proaspete sau fixate, tehnică a cărei caracteristică principală constă în înghețarea țesuturilor, fără a fi impregnate în prealabil cu mediul suport, gelatinat. Prin această metodă se pot obține secțiuni seriate, de 2 μm grosime și, totodată, se evită deteriorarea celulelor prin înghețare și topire, fenomen care se produce frecvent la celulele vegetale, care au pereții relativ rigizi.

3.3.2. Secționarea materialelor incluzionate

Secționarea materialelor incluzionate, folosită mai rar în micologie, este descrisă pe larg de Riker & Riker (1936), Johansen (1940), Langeron (1949), Sass (1951), Nicolescu (1952), Policard & al. (1957), Gray (1958), Conn & al. (1962), Purvis & al. (1964), Peacock (1966), Martoja & Martoja-Pierson (1967), Gabe (1968), Feder & O'Brien (1968), Romeis (1968), Dring (1971) și Mureșan & al. (1974).

3.4. Colorarea

Colorările se folosesc în micologie pentru a înlesni examinarea ciupercilor fără pigmentație naturală, pentru diferențierea miceliilor ciupercilor aflate în țesuturile gazdelor, pentru diferențierea unor compuși citoplasmatici, sau în scopuri taxonomice.

3.4.1. Colorarea citoplasmei și a pereților celulari

A. **Bleu coton** (Albastru de anilină acid, Cotton blue).

1) *Bleu coton în lactofenol:* Se prepară o soluție din 1 g bleu coton pulbere la 200 ml apă distilată, se încălzește și se agită pînă la dizolvarea completă a colorantului. Se filtrează. Se amestecă (per volum) o parte din soluția obținută cu 4 părți lactofenol anhidru ceea ce va da o concentrație de 0,1% (Dade, 1968). Colorarea se face sau prin introducerea materialului în soluția concentrată de 0,1%, încălzire, și apoi transferare în lactofenol pur, sau prin montarea directă în soluție diluată (o parte bleu coton 1% în lactofenol și 2 părți lactofenol hidratat), aceasta din urmă în cazul materialelor delicate, care nu suportă transferarea (Dade, 1968). Este cel mai folosit colorant pentru ciuperci dar nu colorează pereții celulelor ci doar citoplasma (Dade, 1960 b; Silva, 1965).

2) *Bleu coton în acid lactic:* Se dizolvă la temperatura camerei 0,05 g bleu coton pulbere în 30 ml acid lactic. Se filtrează după 24 ore. Este un colorant la fel de bun ca bleu coton în lactofenol, dar acidul lactic produce dilatarea celulelor (Rapilly, 1968). Evidențiază ornamentațiile sporilor de la *Discomycetes* (Dennis, 1968), chiar și în secțiuni (Korf, 1952). A fost utilizat cu succes pentru colorarea diferențiată la *Homobasidiomycetes* (Kotlaba & Pouzar, 1964).

3) *Bleu coton în acid acetic*: Apă distilată 100 ml, bleu coton 0,5 g, acid acetic 3 ml. Este indicat pentru colorarea culturilor pe lame sau a secțiunilor (Langeron & Vanbreuseghem, 1952). Se deshidratează cultura la 37°, se fixează cu o picătură de alcool 95% care se lasă să se evapore. Se colorează cultura cîteva minute cu o picătură de colorant, se spală în apă, se deshidratează cu alcool și se montează în balsam.

B. **Trypan blue** (Albastru de tripan). Se folosește în concentrație de 0,1—0,5% în acid acetic pentru colorări rapide, sau aceeași concentrație în lactofenol, pentru colorări lente (Boedijn, 1956). După Dade (1960 b), 0,2% în lactofenol este concentrația cea mai potrivită. Încălzirea preparatului grăbește colorarea, care se continuă apoi în timp.

Citoplasma se colorează albastru-indigo şi, după Gurr (1965), structurile celulare se diferenţiază clar. Boedijn (1956) a propus înlocuirea bleu coton-ului cu trypan blue, care ar colora şi pereţii celulari dar, după Dade (1960 b), numai stratul intern al peretelui este colorat, nu şi cel extern. După Silva (1965), la unele ciuperci albastrul de tripan colorează doar citoplasma.

C. **Chlorazol black E** (Negru de clorazol). Folosit pentru colorarea ciupercilor de Armitage (1944). Se prepară o soluţie saturată (1 g colorant la 250 ml lactofenol) se agită, se lasă să se decanteze 2—3 zile şi apoi se filtrează. Timpul de colorare este diferit în funcţie de specia de ciupercă. Pentru preparate permanente, din culturi, se foloseşte o soluţie saturată în alcool metilic absolut, filtrată înainte de utilizare. Se deshidratează cultura în alcool etilic 70% timp de 3 ore. Se adaugă soluţia de colorant şi se urmăreşte, la lupa binoculară, procesul de colorare. Se înlătură excesul de colorant cu alcool, se deshidratează şi se montează în euparal. Duddington & Dixon (1951) detaşează o porţiune din cultură (cu suprafaţa de 16 mm² şi groasă de aproximativ 200 μm), o fixează în alcool etilic absolut timp de un minut, o colorează o secundă în chlorazol black, o deshidratează 10 minute în alcool absolut şi apoi o montează în euparal. Peretele celulelor şi al sporilor, ca şi citoplasma, sînt intens colorate. Cele mai bune rezultate se obţin prin folosirea colorantului dizolvat în soluţii alcaline, urmat de diferenţiere cu terebentină care, de obicei, modifică însă forma celulelor (Silva, 1965).

D. **Floxină.** Se prepară trei soluţii : 70% alcool etilic, 5% KOH şi 0,5% floxină. Se pune materialul pe o lamă şi deasupra o picătură de alcool. După evaporarea alcoolului se adaugă o picătură de KOH, apoi una de floxină. Se acoperă cu lamela. După atingerea intensităţii dorite se înlocuieşte colorantul cu lactofenol şi se etanşează preparatul (Tuite, 1969). Micologii americani preferă floxina bleu coton-ului în lactofenol (Watling, 1968), deşi floxina colorează tot numai citoplasma (Silva, 1965).

E. **Fucsină**

1) *Fucsină acidă* 0,1 g în 100 ml lactofenol colorează mai bine decît bleu coton-ul unele ciuperci (Koch, 1968), dar numai citoplasma (Silva, 1965).

2) *Lacto-fucsină* (Carmichael, 1955). Se dizolvă, 0,1 g fucsină acidă în 100 ml acid lactic anhidru. Este superior bleu coton-ului în lactofenol prin aceea că celulele se văd mai bine, colorarea este mai rapidă şi mai potrivită pentru fotografiere. După Smith (1971) preparatele se decolorează repede la lumină, chiar în timpul examinării la microscop.

3) *Fucsină bazică-acid tanic* (Silva, 1965). Se amestecă soluţii apoase de acid tanic 10% şi fucsină bazică 1%. Se centrifughează 15 minute la 2 000 rotaţii/minut şi se colectează supernatantul care va fi folosit la colorare. Se pune materialul de examinat pe lamă, într-o picătură sau două de colorant. Dacă se adaugă o picătură de glicerină 50% preparatele pot fi făcute semipermanente prin etanşare. Spre deosebire de bleu coton, trypan blue, picro-nigrozină, fucsina acidă şi floxina, fucsina bazică — acid tanic colorează şi pereţii celulelor. Nu este indicată folosirea acestui colorant pentru secţiuni obţinute din materiale incluzionate sau secţionate la microtomul cu congelare. Alcorn & Worley

(1936) au folosit carbol-fucsina Ziehl pentru colorarea periteciilor la *Erysiphaceae*.

F. **Picro-nicrozină în lactofenol** (Fleming & Smith 1944). Se dizolvă 2 g nigrozină în 100 ml soluţie saturată de acid picric. Se foloseşte amestecul obţinut, în locul apei, la prepararea lactofenolului. Concentraţia nigrozinei în lichidul de montare va fi de 0,4%. Se pune materialul pentru 30 secunde, pe o lamă, într-o picătură de colorant. Se înlătură colorantul cu hîrtie de filtru, se adaugă lactofenol, se îndepărtează din nou cu hîrtie de filtru, se pune lactofenol curat şi se montează. Ciupercile se colorează în gri. După Weston (1929) acest colorant diferenţiază nucleii şi alte structuri celulare la multe ciuperci şi chiar miceliile în ţesuturile plantelor. Ca şi bleu coton-ul nu colorează pereţii celulari ci doar citoplasma (Silva, 1965). Smith (1971) propune prepararea a două soluţii, una de acid picric cu lactofenol şi alta de nigrozină, care se păstrează separat şi se amestecă, cîte o picătură din fiecare, pe o lamă, înaintea colorării. Un procedeu mai bun, recomandat de acelaşi autor, este introducerea materialului în prima soluţie, înlăturarea excesului, spălarea cu 2—3 picături de apă, colorarea cu o soluţie de 0,4% nigrozină, eliminarea excesului şi montarea în lactofenol.

G. **Tuş** (Rishbeth, 1954). Colonii crescute pe celofan sau pe lamelă, se montează în preparate cu apă, care este înlocuită apoi cu o soluţie de tuş „Pelikan", diluat 1/5—1/10 cu apă. Nu este o colorare ci o evidenţiere a contururilor (Rapilly, 1968), indicată în special pentru ciupercile cu structuri delicate, care sînt deteriorate prin fixare. Miceliile sau conidiile din culturi sau de pe alte substraturi se pot monta şi direct, într-o soluţie diluată de tuş.

H. **Verde de metil în glicerină gelatinată** (Methyl-green in glycerin-jelly). La glicerina gelatinată, preparată după reţeta de la pag. 71, topită, se adaugă soluţie saturată (aproximativ 3%) de verde de metil în alcool 50%, picătură cu picătură, pînă cînd glicerina gelatinată devine ca o cerneală verde (Conn & al., 1962). Pentru colorare materialul se pune pe o lamă într-o picătură de lichid Patterson (vezi pag. 68). Se încălzeşte uşor pînă la evaporarea apei şi alcoolului, în felul acesta obţinîndu-se şi clarificarea materialului. Se aşază peste material un mic bloc de glicerină gelatinată care conţine colorantul, se topeşte prin încălzire şi se amestecă. Se acoperă cu lamelă şi se etanşează cu glyceel sau balsam. Pereţii hifelor şi citoplasma se colorează în verde. Uneori se obţine o colorare diferenţiată a diferitelor părţi ale ciupercilor (Rogers, 1965).

I. **Verde Janus** (Janus Green) (Faust & Pramer, 1964). Se prepară o soluţie de verde Janus 0,01% în tampon 0,2 M acetat de sodiu-acid acetic cu pH = 4,6. Se pune materialul pe o lamă şi se adaugă colorantul picătură cu picătură. Pereţii ciupercilor şi unele structuri celulare se colorează în verde-închis pînă la albastru. A fost folosit pentru colorarea ciupercilor nematodofage.

3.4.2. Colorarea ciupercilor în ţesuturile gazdei

A. **Diferenţierea ciupercilor în secţiuni obţinute din materiale incluzionate.** Tehnicile de fixare, incluzionare, secţionare şi rehidratare sînt cele obişnuite, folosite la materialele vegetale (vezi bibliografia la pag. 53).

1) *Tionin și Orange G.* (Stoughton citat de Conn & al., 1962 și Dring, 1971). Secțiunile se colorează o oră în soluție 0,1% tionin în soluție apoasă de fenol 5%. Se deshidratează în serie de alcooli și se diferențiază în soluție saturată de Orange G în alcool absolut. Se spală în alcool absolut, se clarifică și se montează în balsam. Rezultat : miceliul violet-purpuriu, pereții celulozici galben sau verde, xilemul albastru, cromozomii albastru.

2) *Acid periodic — Schiff* (Conn & al., 1962, Dring, 1971). Prepararea reactivului Schiff : Se toarnă 100 ml apă fierbinte, distilată, peste 0,5 g fucsină bazică, se răcește la 50°, se filtrează și se adaugă 10 ml soluție normală HCl și 0,5 g metabisulfit de potasiu anhidru. Se lasă peste noapte să se decoloreze și se păstrează la 5°, în întuneric.

Materialul se fixează, se incluzionează, se secționează și se rehidratează. Se imersează secțiunile 2—3 minute în acid periodic (H_5IO_6). Timpul de imersare în acid periodic este diferit. Astfel, pentru diferențierea hifelor de *Rhabdocline* în acele de *Pseudotsuga* 2 minute sînt suficiente, în timp ce pentru clamidosporii de *Fusarium,* în rădăcinile aceleiași plante, sînt necesare 6 minute (Farris, 1966).

Se spală în apă de robinet 10 minute și se colorează în reactivul Schiff timp de 5 minute. Se transferă de două ori (în total 10 minute) în amestecul : 5 ml soluție apoasă 10% de metabisulfit de potasiu anhidru ; 5 ml HCl normal ; 90 ml apă distilată. Se spală în apă de robinet (cînd culoarea apare) 10 minute. Se deshidratează în alcool 85% și se colorează în soluție de verde lumină (light green SF) în alcool 95%. Se deshidratează în alcool absolut se clarifică în xilol și se montează în balsam.

Rezultat: Pereții celulelor ciupercii și citoplasma se colorează în purpuriu iar țesuturile plantei în verde.

Incluzionarea, secționarea și colorarea se aplică în general la țesuturile proaspete. Cunningham (1969) descrie o metodă prin care și țesuturile vegetale uscate, conservate, pot fi rehidratate și tratate ca cele proaspete.

Alte metode de colorare a secțiunilor obținute din materiale incluzionate sînt descrise în lucrările prezentate în tabelul 3.

B. **Diferențierea ciupercilor în secțiuni obținute din materiale neincluzionate.** Deoarece incluzionarea și secționarea la microtom a materialelor

Tabelul 3

COLORAREA CIUPERCILOR ÎN SECȚIUNI OBȚINUTE DIN MATERIALE INCLUZIONATE

Gazda	Ciuperca	Colorant	Autorul
Vitis vinifera	*Plasmopara viticola*	bleu coton și safranină	Lepik (1928)
Gladiolus	*Sclerotinia*	Pianeze III	Simmons & Shoemaker (1952)
Zea mays	*Ustilago maydis*	safranină și albastru de anilină	Vágás & Maácz (1960)
Lactuca sativa	*Bremia lactucae*	safranină	Marlatt & al. (1963)

vegetale este laborioasă și nu se poate aplica la analiza unui număr mare de probe, s-au descris metode prin care materialele fixate sau nu, se secționează „de mînă" sau la un microtom cu congelator, se colorează și se montează în preparate provizorii sau semipermanente.

O metodă simplă constă în încălzirea secțiunilor, pe o lamă, într-o picătură de trypan blue în lactofenol sau alt colorant, înlocuirea colorantului cu lactofenol pur și montarea. Hifele ciupercilor astfel colorate se diferențiază de țesuturile gazdei.

În tabelul 4 sînt indicate cîteva lucrări în care s-au folosit tehnici similare, la ciupercile prezente în țesuturile plantelor erbacee, sau în țesuturile lignificate ale arborilor.

Tabelul 4

COLORAREA CIUPERCILOR ÎN SECȚIUNI OBȚINUTE DIN MATERIALE NEINCLUZIONATE

Gazda	Ciuperca	Colorant	Autorul
		Țesuturi nelignificate	
Musa	*Cercospora*	trypan blue	Goos & Tschirsch (1963)
Lactuca sativa	*Bremia lactucae*	orseillin BB	Marlatt & al. (1963)
Diferite	*Peronosporaceae* (haustori)	resorcin blue	Fraymouth (1956)
„	„	albastru de anilină	Fraymouth & Hawker (1952)
„	diferite	hematoxilină	Isaac (1958)
Hordeum (embrioni)	*Ustilago nuda*	trypan blue	Popp (1958 a)
Zea mays	*Ustilago maydis*	albastru de anilină	Mihalevskaia (1966)
Berberis vulgaris	*Puccinia graminis*	hematoxilină și eozină	Durand (1911)
Cruciferae	*Peronospora parasitica*	„ „	„
		Țesuturi lignificate	
Diferite	diferite	methyl violet	Hubert (1922)
Pinus sp.	*Peridermium*	orseillin BB și albastru de anilină	Hutchinson (1936)
Diferite	*Polyporaceae*	acid picric și albastru de anilină	Grosjean (1942)
Cupressus	*Monochaetia și Pestalotia*	verde de iod și eritrozină	Ciccarone (1946)
12 specii	14 specii	fast green, light green și safranină	Gram & Jørgensen (1953)
Pinus	*Cronartium*	orseillin BB, safranină și albastru de anilină	Jewell (1958)
Diferite	diferite	safranină, acid picric și albastru de anilină	Altman (1966)

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

C. **Diferenţierea ciupercilor în preparate integrale** („in toto" ; „whole mounts"). Deseori, prin secţionarea ţesuturilor nu se obţine o imagine reală a poziţiei miceliului ciupercii şi a relaţiilor dintre acesta şi ţesuturile gazdei. Pentru înlăturarea acestui inconvenient materialul se poate trata în aşa fel încît ţesuturile gazdei să fie decolorate, iar miceliul ciupercii colorat. Cel mai folosit agent pentru decolorare este KOH, în soluţii de concentraţii diferite. Durata decolorării depinde de duritatea ţesuturilor şi gradul de deshidratare. Se mai utilizează în acelaşi scop diferiţi compuşi ai clorului iar Leben (1952) obţine decolorări rapide cu piridină. O tehnică simplă este următoarea (Tuite, 1969) : Se pune materialul (fragmente de frunze sau tulpini tinere, rădăcini fine, embrioni etc.) timp de 10—12 ore în soluţia : 5 părţi cloral hidrat, 2 părţi apă distilată, 0,1% albastru de anilină. După colorare se montează în cloral hidrat pentru cîteva ore. După Bell (1951) rezultate mai bune se obţin cînd colorarea se face la vacuum, de două ori, iar materialul este ţinut apoi 4 ore la 60°. Tabelul 5 cuprinde lucrări în care s-a folosit tehnica preparatelor „integrale" (vezi şi Tuite, 1969, pag. 205—208).

Tabelul 5

COLORAREA CIUPERCILOR ÎN PREPARATE INTEGRALE

Gazda şi organul	Ciuperca	Colorant	Autorul
Lycopersicon esculentum (frunze)	*Stemphyllium solani*	bleu coton	Diener (1955)
Trifolium (frunze)	*Ascochyta*	bleu coton	Latch & Hanson (1962)
Triticum (frunze)	*Penicillium glaucum*	albastru de anilină	Noll (1949)
„ „	*Puccinia graminis*	bleu coton	Shipton & Brown (1962)
„ „	„	albastru de metil ; roşu neutru	Silverman (1959)
Hordeum (frunze)	*Erysiphe graminis*	bleu coton	White & Baker (1954)
Beta vulgaris (frunze)	*Erysiphe betae*	iod	Drandarevski & Weltzien (1966)
Allium cepa (frunze)	*Botrytis*	fucsină acidă	Segall & Newhall (1960)
Lotus corniculatus (frunze)	*Stemphyllium*	fucsină acidă bismark brown	Drake (1963)
Lactuca sativa (frunze)	*Bremia lactucae*	orseillin BB	Marlatt & al. (1963)
Diferiţi arbori (frunze)	diferite	safranină	Hering & Nicholson (1964)
—	*Uredinales*	fucsină acidă acid picric	McBride (1936)
Diferite (rădăcini)	*Endogone* sp.	bleu coton	Bevege (1968)
„	diferite	fucsină acidă	Gerdemann (1955)

Tabelul 5 (continuare)

Gazda şi organul	Ciuperca	Colorant	Autorul
Allium cepa (rădăcini)	micorize	trypan blue	Phillips & Hayman (1970)
Hordeum (embrioni, pai)	*Ustilago nuda*	trypan blue	Morton (1961)
Hordeum (embrioni)	*Ustilago nuda*	trypan blue	Popp (1958 b) Morton (1960 ; 1961)
Triticum (embrioni)	„	trypan blue	Popp (1958 b)
„	„	albastru de anilină	Skvorţov (1937)
Diferite (frunze)	diferite	fucsină	Daft & Leben (1966)

3.4.3. Colorarea nucleilor

A. **Giemsa** (Anonim, 1968; Furtado, 1968). Se triturează 3,8 g Giemsa pudră şi se dizolvă în 250 ml glicerină şi 250 ml alcool metilic absolut. Înainte de folosire această soluţie se diluează prin adăugarea de 15 ml tampon fosfat (pH = 6,9) la fiecare ml colorant. Se fixează sporii şi miceliile, timp de 10—12 minute, în amestec de 3 părţi alcool etilic absolut şi o parte acid acetic glacial, sau în amestecul : 3 părţi alcool etilic absolut, 1 parte acid acetic glacial şi o parte acid lactic. Se spală în alcool 95% şi se transferă în alcool 70%, unde poate fi păstrat cîteva zile înainte de colorare. Se spală în apă distilată. Se imersează în soluţie normală de HCl, 5 minute, la temperatura camerei. Se transferă în soluţie normală de HCl la 60°, timp de 7 minute. Se spală în apă distilată şi apoi în tampon fosfat (*p*H = 6,9), de cîte 5 ori în fiecare. Se imersează în colorant timp de 2 ore, se spală în tampon fosfat şi apoi în apă distilată. Fragmentele de material se pot strivi între lamă şi lamelă pentru a obţine un preparat provizoriu, sau se deshidratează la aer şi se montează în euparal. Rezultat : Nucleii se colorează roz iar citoplasma rămîne în general clară sau albastru-deschis. Giemsa s-a dovedit cel mai bun colorant pentru nucleii dermatofiţilor, din 13 coloranţi încercaţi (Fritsch, 1969).

B. **Carmin** (Singh, 1969). Se prepară soluţia de colorant, adezivul Haupt şi lichidul Newcomer, în felul următor :

Soluţia de colorant : Se fierbe 0,5 g carmin pudră în 100 ml acid propionic 40% şi se filtrează după răcire. Se adaugă 3—5 picături dintr-o soluţie saturată de clorură ferică.

Adezivul Haupt : Se dizolvă 1 g gelatină pură, granulată, în 100 ml apă distilată, la 30°. După dizolvare se adaugă 2 cristale de fenol şi 15 ml glicerină. Se întinde un strat subţire pe o lamă şi se lasă să se evapore. Se umectează cu soluţie de formalină 4%. Se pun pe lamă secţiunile sau materialul şi se încălzeşte uşor la 40° ; formalina se evaporă şi materialul se fixează.

Lichidul Newcomer : dioxan 10 ml, acetonă 10 ml, eter de petrol 10 ml, acid propionic 30 ml, alcool izopropilic 60 ml.

EXAMINAREA Se pune o picătură de suspensie densă de conidii sau miceliile pe o lamă cu adeziv Haupt și se deshidratează cîteva minute la temperatura camerei. Se fixează 24 ore în lichidul Newcomer, se transferă pentru 20 minute în soluție de NaCl 0,17 M și se spală în apă. Se transferă pentru 4 ore în soluție 2% $LiCO_3$. Se pune o picătură de colorant, se acoperă cu lamela și se încălzește. Rezultat : nucleii se colorează în roșu, iar citoplasma rămîne necolorată sau se colorează în roz-deschis.

C. **Hematoxilina** este un alt colorant utilizat frecvent în studiile de citologie. Modul de folosire este descris pe larg de Conn & al. (1962) și Dring (1971), iar Davis (1922), Pauli (1956) și Isaac (1958) relatează rezultatele excelente obținute cu acest colorant la ciuperci din diferite grupe sistematice.

Informații asupra altor coloranți pentru nuclei se găsesc în lucrarea lui Tuite (1969 : 212—213) ca și în lucrările menționate în tabelul 6.

Tabelul 6

COLORAREA NUCLEILOR

Ciuperca	Fixator	Colorant	Autorul
Penicillium *Aspergillus* *Neurospora*	Carnoy	orceină acetică	Laane (1968)
Lophodermium *Rhytisma*	alcool-acid acetic	orceină	Morgan-Jones & Hulton (1973)
Helminthosporium	fenol, acid acetic, clorură ferică	fucsină acidă	Maneval, după Parris (1944)
———	Schaudinn	fucsină bazică	DeLamater (1948)
Ascomycetes *Deuteromycetes* *Basidiomycetes*	nefixate	toluidine blue	Furtado (1970)
Xenogloea eriophori	———	trypan blue	Koo (1956)
———	I, KI, acid acetic, formaldehidă	carmin acetic	Jensen (1962)
Entyloma dahliae	Flemming	violet de gențiană	Grouet (1962)
Verticillium	Carnoy	Schiff	Roth & Brandt (1964)
Rhizoctonia solani	———	albastru de anilină	Tu & Kimbrough (1973)

3.4.4. Colorări speciale

A. **Colorarea diferențiată a unor structuri morfologic sau fiziologic diferite :**

Sporii și celulele vegetative vii și moarte la *Aspergillus* și *Penicillium* (Gray, 1941).

Scleroți vii și morți la *Sclerotinia trifoliorum* (Hristov, 1941).

Ascospori și celule vegetative la levuri (Guyotjeanin, 1950; Kelly & Gay, 1969).
Bazidii la *Agaricales* (Grund & Marr, 1965).
Formații „în cîrlig" la *Basidiomycetes* (Boidin, 1951).
Cistidele la diferite specii (Metrod, 1949).
Evidențierea porilor la uredospori (Urban, 1963).
Micelii, sporidii și teliospori la *Ustilago tritici* (Iablokova, 1936).
Structura membranelor fine (Loquin, 1952).
Sporangii de rezistență la *Synchytrium* (Nelson & Olsen, 1967).
Anelațiile celulelor conidiogene (Shoemaker, 1964).
Flageli (Ende, 1951; Cunningham & Hagedorn, 1960; Altman, 1966: 47—49; Koch, 1968: 28—30; Alexopoulos & Beneke, 1968: 3).
Cromozomi (Gurr, 1965: 284—285; Koch, 1968: 26—27; Lowry, 1963; Darlington & La Cour, 1962; Henderson & Lu, 1968).
Mitocondrii (Reiss, 1969; Lindegren & Bemiller, 1969).

B. **Teste pentru decelarea unor compuși chimici** (vezi și Glick, 1949; Rawlins & Takahashi, 1952; Jensen, 1962; Gomori, 1952; Koch & Hanke, 1953):

Amidon (Gurr, 1965: 298—299; Koch, 1968: 26; Gurr, 1958: 79—80).
Celuloză (Gurr, 1958: 88—89; Skalický & Jechová, 1964; Koch, 1968: 25; Tuite, 1969: 211).
Caloză (Koch, 1968: 25; Pfister, 1970).
Chitină (Langeron, 1949: 136; Gurr, 1958: 79—80; Skalický & Jechová, 1964; Gurr, 1965: 254—255; Koch, 1968: 25; Tuite, 1969: 209).
Glicogen (Langeron & Vanbreuseghem, 1952: 371; Gurr, 1958: 89—92; Conn & al., 1962; 160—162, 167—168; Gurr, 1965: 298—299).
Lipide (Langeron & Vanbreuseghem, 1952: 371; Gurr, 1958: 119—133; Conn & al., 1962: 153—160; Koch, 1968: 26; Evlahova & Voronina, 1970).
Mucilagii și geluri (Moore, 1965; Reiss, 1971).
Substanțe pectice (Thomas, 1928, 1930; Pigman & Goepp, 1948; Reeve, 1959; Kertész, 1951; Koch; 1968: 26; Pfister, 1970).

C. **Teste chimice folosite în taxonomie.** *Ascomycetele* și *Basidiomycetele* sînt grupele în care reacțiile microchimice au fost utilizate în scopul diferențierii taxonilor de ranguri diferite.

Cel mai cunoscut și probabil cel mai vechi este reactivul Melzer. Sporii cu membrane amiloide se colorează în gri-albăstrui sau gri-negru, cei neamiloizi rămîn incolori sau se colorează în galben-brun sau brun-roșcat. În afara acestor reacții de colorare, reactivul Melzer produce și o clarificare a țesuturilor (Langeron & Vanbreuseghem, 1952). Este folosit pentru colorări diferențiale ale porului apical al ascelor la *Ascomycetes* (Korf, 1962; Dennis, 1968). Semnificația taxonomică a reacțiilor obținute la colorarea pereților sporilor și hifelor la ciupercile superioare, cu acest colorant, este discutată

Iodură de potasiu	5	g
Iod	1,5	g
Apă distilată	100	ml
Cloral hidrat	100	g

de Loquin (1951) și Smith (1965), iar Wright (1964 a, 1964 b) îl folosește pentru diferențierea taxonilor infragenerici la genul *Poria*. Testele chimice sînt folosite frecvent în taxonomia *Agaricalelor* și altor *Basidiomycetes*. Detalii asupra tehnicilor de lucru și asupra interpretării rezultatelor sînt sintetizate de Disbrey & Watling (1967) și Watling (1971).

3.5. Preparate microscopice

Pentru examinare la microscop, ciupercile sau părți ale acestora trebuie fixate pe un suport transparent, într-un mediu al cărui indice de refracție să fie cît mai apropiat de al sticlei, dar puțin diferit de cel al miceliului sau fructificațiilor ciupercii. În general, în preparate se montează sporii sau conidiile, împreună cu structurile care le poartă, sau fragmente ori secțiuni din țesuturile în care se află ciuperca.

Preparatele pot fi provizorii, și atunci se păstrează numai atît cît este necesar pentru examinare, sau semipermanente, care pot fi conservate timp îndelungat în colecții. Mediul de montare, adică soluția în care se include materialul, poate rămîne lichid (folosit la preparatele provizorii care pot fi făcute semipermanente prin etanșare) sau se poate solidifica prin evaporarea solventului, obținîndu-se în acest fel preparate semipermanente. Deocamdată nu se cunoaște nici o metodă prin care să se realizeze preparate permanente, în care structurile morfologice ale ciupercilor montate să rămînă nealterate timp nedefinit.

Lamele și lamelele folosite la preparatele microscopice, chiar și cele noi, trebuie spălate cu detergenți, clătite cu apă de robinet, apă distilată și uscate. Degresarea cu substanțe chimice oxidante nu este recomandabilă pentru preparatele în medii lichide (Dade, 1968). Lamele și lamelele pot fi păstrate, uscate, ferite de praf, în vase de sticlă sau în alcool. În ultimul caz, la utilizare, se scot din alcool și se șterg cu o pînză moale, foarte curată.

3.5.1. Preparate în medii lichide

A. **Operații preliminare**

1) *Restaurarea turgescenței* este necesară în special la examinarea materialelor uscate, de herbar, și se poate realiza prin încălzire în lichidul de montare sau prin înmuiere prealabilă în KOH. Prin încălzire și răcire repetată se obține revenirea la turgescența normală și, în cazul utilizării lactofenolului, chiar o clarificare a sporilor (Savile, 1971). Încălzirea se face de obicei la flacăra unui bec de gaz sau lămpi cu spirt. Ambele au dezavantajul că sub lamă se depun particule de funingine, preparatul se poate supraîncălzi, ceea ce are ca urmare dizolvarea pigmenților naturali și uneori chiar „explozia" preparatului, prin dilatarea bruscă a aerului și aruncarea lamelei și materialului. De asemenea, în timpul încălzirii unui preparat, nu se pot face alte operații. O metodă mult mai bună este utilizarea unei cutii din tablă (fig. 16), prevăzută cu un bec de 40 W, pe care se pot încălzi în același timp 8—10 lame, fără inconvenientele amintite.

Revenirea la turgescența normală se poate obține și prin înmuierea materialului într-o soluție apoasă de KOH, 2—10%, timp de cîteva secunde pînă la 30 minute, la temperatura camerei sau încălzit pînă la fierbere. Concentrațiile, timpii și temperaturile mai scăzute se folosesc la materialele mai delicate. După preparare, soluția se filtrează pentru îndepărtarea precipitatului alb care se formează. Soluția de KOH nu trebuie păstrată timp îndelungat (A l t m a n, 1966). Fierberea cîteva secunde în KOH ajută și la clarificarea țesuturilor vegetale, uscate, prin dizolvarea pigmenților (A l e x o p o u l o s & B e n e k e, 1968). Dacă materialul va fi inclus într-un preparat semipermanent, atunci KOH trebuie îndepărtat înainte de montare, prin spălare cu apă, deoarece are un efect de dilatare și chiar de modificare a formei sporilor (M c K n i g h t, 1968). *KOH poate deteriora obiectivul microscopului așa că trebuie evitat contactul soluției cu obiectivul sau, dacă aceasta s-a întîmplat, obiectivul va fi curățat imediat.*

2) *Deshidratarea* se face prin pipetarea de alcool 70% și apoi alcool absolut, peste materialul așezat pe o lamă și, înainte ca acesta să se evapore complet, se va pune o picătură de lichid de montare.

3) *Montarea materialelor.* Pe o lamă microscopică se pune la mijloc, sau la 1/3 față de unul din capete, o picătură din lichidul de montare. Lamela se așază întîi cu o latură pe suprafața lamei, la o distanță mică față de picătura de lichid, și apoi se coboară lent, cu ajutorul unui ac, peste picătură, sau, în cazul unui lichid de montare foarte fluid, se ține paralel cu lama la distanță foarte mică și se așază dintr-o dată. Cantitatea trebuie astfel potrivită încît, după așezarea lamelei, lichidul să umple spațiul dintre lamă și lamelă. Cu oarecare experiență se poate ajunge la aprecierea acestei cantități. Dacă spațiul nu s-a umplut, se va presa ușor cu acul în partea centrală a lamelei. Dacă totuși rămîn spații goale, se va adăuga lichid cu o micropipetă sau, cu un ac foarte fin, neascuțit, se vor pune picături mici la marginea lamelei. Dacă lichidul este în exces se va proceda, după D a d e (1960 b, 1968), în felul următor: Se pune peste lamelă o foaie de hîrtie de filtru sau sugativă. Ținînd hîrtia fixată de un capăt al lamei, se presează foarte ușor cu degetul marginile lamelei, niciodată mijlocul, pînă cînd lichidul în exces este absorbit de hîrtie. De obicei, în urma acestei operații, mai rămîn urme de lichid care pot fi îndepărtate prin ștergere cu un tampon de vată îmbibat în alcool, avînd grijă ca lamela să nu se deplaseze, iar apoi se încălzește preparatul pînă la evaporarea completă a urmelor de lichid. Este foarte important ca lama și lamela să fie perfect curățate deoarece în caz contrar nu se poate asigura aderența substanțelor folosite pentru etanșare.

4) *Îndepărtarea aerului din preparate.* Deseori bule de aer sînt incluse printre fructificații, micelii, sau aderă la suprafața sporilor care se aglomerează în preparat, iar lichidul de montare nu poate pătrunde și umecta materialul. Deși pentru preparatele semipermanente în-

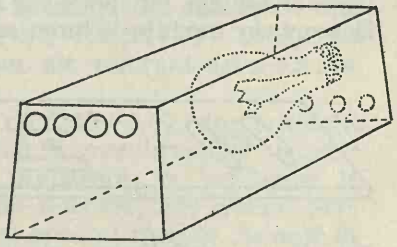


Fig. 16 — Dispozitiv pentru încălzirea preparatelor microscopice

depărtarea aerului este obligatorie, în unele cazuri ornamentațiile foarte fine ale sporilor de dimensiuni mici se pot observa mai bine pe suprafețele sporilor care vin în contact cu bulele de aer (D r i n g, 1971).

O metodă simplă constă în agitarea materialului în lichid, cu un ac, pentru a-l umidifica uniform. Uneori este suficientă încălzirea preparatului, înainte de acoperire cu lamela, pentru a îndepărta bulele de aer (S m i t h, 1971). Așezarea lamelei, întîi cu o latură pe lamă și apoi coborîrea foarte lentă peste lichid și totodată punerea unei picături de lichid și pe fața inferioară a lamelei (D a d e, 1960 a), favorizează îndepărtarea bulelor.

Depunerea materialului pe lamă într-o picătură de alcool, sau pipetarea de alcool peste materialul pus pe lamă, înlocuirea alcoolului înainte de evaporarea completă cu lactofenol și agitarea materialului cu un ac, poate da rezultate satisfăcătoare (S m i t h, 1971). Eliminarea aerului se poate face și după ce materialul a fost depus într-o picătură de lactofenol pe lamă. Se pune deasupra materialului o picătură de acetat de etil sau metil, care-l va umecta, iar prin încălzire acetatul va fi înlocuit de lactofenol (T s c h u d y, 1936 ; D a d e, 1968). În mod similar se poate folosi și un amestec de 75 părți eter și 25 părți alcool (S k e r m a n, 1946 ; S k e r m a n & D e m e n t j e w a, 1953).

În unele cazuri, mai ales la *Pyrenomycetes* și *Sphaeropsidales*, o bulă de aer este localizată chiar în centrul fructificației și nu poate fi îndepărtată prin mijloacele amintite. În acest caz cea mai bună metodă este introducerea preparatului, acoperit cu lamela, într-un exsicator și, prin crearea unei depresiuni cu o trompă de vid, se obține eliminarea aerului. S m i t h (1971) recomandă imersarea materialului în lichid, într-o sticlă de ceas și utilizarea repetată a procedeului descris mai sus.

5) *Imobilizarea materialului.* Aproape întotdeauna la așezarea lamelei peste picătura de mediu lichid se produce o migrare a materialului, în special a sporilor, spre marginea lamelei. Acest lucru se poate întîmpla și la încălzirea preparatului, mai ales cînd aceasta se face la flacără, bulele de aer antrenînd spre marginea preparatului o parte din material. Pentru fixarea și concentrarea sporilor, S a v i l e (1971) recomandă următoarea metodă : Se pune pe o lamă o picătură foarte mică de lichid, de maximum 2 mm diametru și în ambele părți ale acesteia, două striuri de lichid la distanță de cel puțin 5 mm (fig. 17). Cu acul umectat se transferă o cantitate de spori în picătura centrală și se amestecă. Așezînd lamela deasupra, lichidul din striurile laterale va umple spațiul dintre lamă și lamelă, iar sporii vor rămîne în partea centrală a preparatului. Deseori, în mediile lichide, sporii sau conidiile de mici dimensiuni se deplasează tot timpul, mai ales la folosirea obiectivului cu imersie, și nu sînt toți în același plan, ceea ce reprezintă un inconvenient la microfotografiere. Pentru înlăturarea acestui neajuns, P h i n n e y & H a r d i s o n (1954) propun următoarea metodă : Pe lamă se pune o picătură de apă, materialul de analizat și apoi se presară pulbere de carboxi-

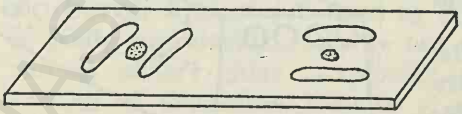


Fig. 17 — Imobilizarea sporilor în centrul preparatelor microscopice (redesenat după S a v i l e, 1971)

metil-celuloză de sodiu pînă se obţine vîscozitatea dorită. Se aplică lamela şi, printr-o deplasare pe orizontală a acesteia, se poate obţine nu numai aranjarea într-un singur plan a sporilor, dar chiar şi orientarea lor pe aceeaşi direcţie ceea ce facilitează măsurarea, mai ales în cazul sporilor cu dimensiuni între 1—3 μm. Preparatele astfel obţinute sînt provizorii.

B. **Lichide pentru montare**

1) *Lactofenolul* (Amann, 1896). Se amestecă primele trei componente şi se încălzesc pînă se dizolvă cristalele de fenol. Se filtrează prin hîrtie de filtru obţinîndu-se astfel lactofenol anhidru, care se poate hidrata prin adăugarea apei distilate. La prepararea lactofenolului hidratat se încălzeşte fenolul cu apa pînă la dizolvare, se adaugă acidul lactic şi glicerina (Anonim, 1968). Se păstrează în sticle brune. Indicele de refracţie este 1,44 la lactofenolul hidratat şi 1,48 la cel anhidru, acesta din urmă fiind mai potrivit pentru montarea ciupercilor cu pigmentaţie naturală (Dade, 1960 a). Lactofenolul este cel mai folosit lichid de montare (Dring, 1971). Într-o singură operaţie asigură fixarea, clarificarea ţesuturilor, colorarea (dacă se adaugă un colorant), conservarea, şi redă turgescenţa normală a miceliilor sau fructificaţiilor contractate, ceea ce îl face foarte potrivit pentru ciupercile cu structuri fragile care nu suportă tratamente mai drastice în timpul montării (Linder, 1929 ; Weston, 1929 ; Dade, 1960 a, 1968). Este miscibil cu majoritatea coloranţilor şi mai ales cu derivaţii de anilină (Langeron & Vanbreuseghem, 1952).

Fenol cristalizat	20 g
Glicerină	31 ml
Acid lactic	16 ml
Apă distilată	20 ml

Lactofenolul are indicele de refracţie apropiat de cel al hifelor astfel că deseori structurile nepigmentate natural nu se pot distinge destul de bine decît dacă se folosesc coloranţi (Carmichael, 1955). După Fleming & Smith (1944) şi Smith (1971) lactofenolul produce uneori decolorarea ciupercilor cu pigmentaţie naturală şi dizolvă unele componente din celule, care sînt depuse apoi ca mici picături uleioase în jurul materialului, deteriorînd în felul acesta preparatul. După Savile (1971) claritatea detaliilor pereţilor teliosporilor de *Uredinales*, montaţi în lactofenol, diminuează după cîţiva ani.

2) *Cloral — lactofenol.* Are un indice de refracţie ridicat (1,49) şi clarifică mai bine decît lactofenolul (Langeron, 1949 ; Langeron & Vanbreuseghem, 1952 ; Dade, 1960 a).

Cloral hidrat (cristalizat)	20 g
Fenol (cristalizat)	10 g
Acid lactic	10 g

3) *Acidul lactic* este un mediu foarte bun de montare, dar măreşte volumul materialelor incluse (Langeron, 1949 ; Rapilly, 1968). La acidul lactic se poate adăuga bleu coton sau alt colorant (Anonim, 1968).

4) *Glicerina pură* are un indice de refracţie de 1,45—1,47, dar o soluţie 50% în apă distilată permite observarea chiar a membranelor delicate care în glicerina pură nu sînt vizibile. La preparare, se încălzeşte în vase de sticlă sau porţelan pînă la punctul de fierbere, dar numai pentru un moment, în scopul eliminării aerului, şi apoi se răceşte. Înainte de montare în glicerină materialul trebuie fixat în soluţie de formalină 4—5% (38—40% formaldehidă) sau alt fixativ, trecut printr-o baie preliminară de glicerină 50% şi apoi montat, definitiv, în soluţie de aceeaşi

concentrație (Dade, 1960 a, 1968). După Fleming & Smith (1944) glicerina în soluție apoasă nu este un mediu conservant.

5) *Apa.* Dacă există suficient material, orice ciupercă trebuie examinată într-un preparat provizoriu în apă de robinet sau apă distilată, deoarece nici un mediu de montare n-are un indice de refracție atît de scăzut ca apa (Dade, 1968).

Sporii și hifele montate în apă sînt deseori dilatate datorită osmozei și se aglomerează, împreună cu bulele de aer, ceea ce împiedică examinarea (Smith, 1971). Aceste neajunsuri se pot corecta prin aplicare, înainte de montare în apă, a unei picături de alcool 70% și folosirea unei soluții saline 5% (Dring, 1971) sau soluție de glucoză 1% (Brummelen 1967), în loc de apă curată. Apa este mediul cel mai potrivit pentru examinarea levurilor, a unor specii de mucegaiuri puternic pigmentate a căror conidii se deformează puternic în lactofenol (Smith, 1971), ca și a *Pyrenomycetelor* (Munk, 1957). Preparatele în apă se pot păstra cîteva zile, dacă se etanșează cu lac pentru unghii sau Glyceel. În apă se pot include și coloranți ca floxina 0,5% sau azur A 1% (Dring, 1971).

6) *Uleiul de parafină.* Dacă fructificațiile ciupercii se transferă cu grijă, sub lupa binocular, în acest mediu, atunci conidiile rămîn atașate de conidifori (Altman, 1966).

7) *Wittmann* (1970) propune un mediu lichid în care se face fixarea, clarificarea și colorarea.

Cloral hidrat	30 g	Albastru de anilină	0,03 g
Acid lactic 90%	20 ml	Chlorazol black E	0,02 g
Alcool absolut	5 ml		

C. **Etanșarea sau „lutarea" preparatelor** în medii lichide este necesară pentru a evita evaporarea lichidului de montare. Substanțele folosite în acest scop trebuie să nu reacționeze cu lichidul, să fie impermeabile, dure, elastice, persistente și să adere la sticlă. Suprafețele lamei și lamelei, pe care se aplică substanțele de etanșare, trebuie să fie perfect uscate și curate.

1) *Rășinile naturale* cum ar fi colofoniul folosit la lutul Noyer (Langeron, 1949), sau Krönig, dammar-ul folosit la lutul lui Waller (Dade & Waller, 1949), guma arabică (Wittmann, 1970), șelacul (Fleming & Smith, 1944; Tuite, 1969; Smith, 1971), balsamul de Canada etc., reacționează cu fenolul sau alți compuși din lichidul de montare și după un timp preparatele devin opace (Barghoorn, 1947; Dade & Waller, 1949; Bisby, 1953; Dade, 1960 b). Deși inconvenientul este cunoscut de majoritatea micologilor care au folosit aceste „luturi", în literatură, în special în cea de limbă română, lutul lui Noyer este prezentat ca singura soluție pentru etanșarea preparatelor.

2) *Rășinile sintetice* nu au căpătat o folosire largă deși, încă acum 26 ani (Barghoorn, 1947), s-a preconizat întrebuințarea unor rășini fenolice „Tufon" sau acetat de vinil.

3) *Lacul pentru unghii* a fost folosit, probabil, prima dată în S.U.A., în perioada 1939—1945 (Laundon, 1971) și a devenit cel mai utilizat „lut", mai ales datorită faptului că se usucă rapid și se manipulează ușor. Modul de folosire, după Dade (1960 b), este următorul: Se curăță lama și lamela de excesul de lichid care, eventual, depășește spațiul dintre ele (vezi pag. 63). Cu ajutorul unei pensule se aplică un strat îngust de

lac incolor, peste marginea lamelei și suprafața lamei din imediata apropiere a acesteia. După uscarea lacului, în caz că a mai rămas totuși lichid pe lamă și lamelă, se spală preparatul sub curent slab de apă de robinet și apoi se clătește cu apă distilată. Se îndepărtează picăturile de apă rămase, cu ajutorul hîrtiei de filtru, și se lasă să se usuce complet. Se aplică un al doilea strat de lac incolor și apoi, după uscare, cîteva straturi de lac colorat (dar nu sidefat). Fiecare strat va fi ceva mai lat decît cel precedent și se va aplica numai după ce acesta s-a uscat. Deoarece lacul are o rezistență mecanică slabă s-au făcut încercări de a-l proteja și întări cu alte substanțe. Dade (1960 a, 1960 b) propune aplicarea, peste cele două straturi de lac incolor, a unui strat de Araldită (rășină sintetică) dar dificultățile de preparare și manipulare au făcut ca utilizarea Araldítei să fie foarte limitată. Laundon (1971) preconizează folosirea, în același scop, a unui strat de clei de tîmplărie preparat pe bază de acetat de polivinil, dar acest clei, ca și balsamul de Canada, nu a dat rezultate mulțumitoare în încercările noastre.

4) *Cimentul Thorner* cunoscut și sub denumirile comerciale de „Zut" sau „Glyceel" (produs de G. T. Gurr), a fost folosit inițial la etanșarea preparatelor cu nematozi (Thorner, 1935 citat de Tuite, 1969) și a intrat în atenția micologilor abia în anii din urmă (Isaac, 1964; Tribe, 1972). Glyceel-ul este un lichid siropos, incolor, se usucă repede formînd o peliculă elastică, rezistentă, care aderă foarte bine la sticlă. Este cel mai bun produs folosit în momentul de față pentru etanșarea preparatelor în lactofenol și se aplică în felul următor (fig. 18 *A*): Cu o pensulă foarte fină se „lutează" preparatul cu un strat îngust de glicerină gelatinată caldă, fluidă, care are scopul de a „rotunji" muchiile lamelei și unghiul dintre lamelă și lamă (procedeu recomandat de G. L. Hennebert și comunicat de H. A. van der Aa). După ce glicerina gelatinată s-a întărit, se aplică un singur strat, lat, de Glyceel. Nu este indicată aplicarea a două straturi deoarece primul se va încreți. De obicei se folosește o pensulă care se păstrează în vapori de acetat de butil. O soluție mai bună (recomandată de C. Zahariadi), constă în turnarea unei cantități mici din soluția stoc de Glyceel într-o sticluță pentru lac de unghii care are atașată de capac și o pensulă. În acest fel se evită și evaporarea solventului, ceea ce face inutilă diluarea periodică a Glyceel-ului cu acetat de butil.

Ulei polimerizat „Archer Daniels Midland"	31,75 ml
Alcool metilic, industrial	4,76 ml
Acetat de butil	20,41 ml
Toluol (fără sulf)	20,41 ml

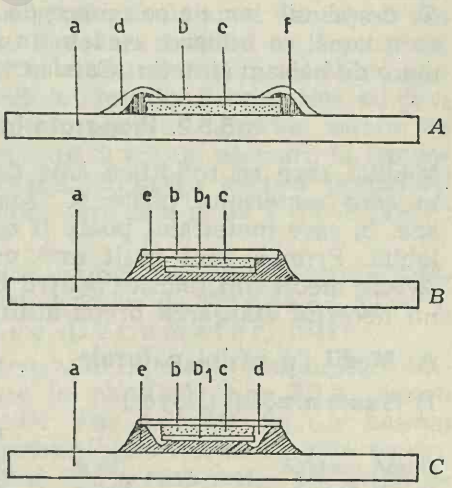


Fig. 18 — Etanșarea preparatelor microscopice :

A cu Glyceel ; *B* — metoda lamelei duble ; *C* — Metoda lamelei duble, modificată : *a* — lamă ; *b* și b_1 — lamele ; *c* — lichidul de montare cu materialul ; *d* — Glyceel ; *e* — balsam de Canada ; *f* — glicerină gelatinată

D. **Lamela dublă** (Diehl, 1929 ; 1940 ; Chupp, 1940 ; 1941) (fig. 18 *B*). Se folosesc două lamele, una de 22 sau 24 mm și a doua de 18, 16 sau 12 mm. Pe lamela mică se pune o picătură din lichidul lui Patterson sau Shear (300 ml soluție apoasă de acetat de potasiu 2% ; 120 ml glicerină și 180 ml alcool 95%) și în acest mediu fragmentul care trebuie montat. Se încălzește la un microarzător pînă se evaporă aproape tot lichidul. Se pune deasupra o picătură de glicerină și se încălzește din nou, imediat, pentru ca glicerina să îndepărteze apa. Se răstoarnă lamela mică peste cea mare și se încălzește. Se înlătură excesul de glicerină de pe margini și se încălzește iarăși. Pe lamă se pune o picătură mare de balsam de Canada, se încălzește puțin și apoi se așază deasupra cele două lamele, cea mică fiind dedesubt. Se presează ușor pentru ca balsamul să etanșeze spațiul dintre lamele. Este foarte important ca în timpul montării să se încălzească permanent preparatul pentru a înlătura orice urmă de apă care, dacă rămîne în contact cu xilolul din balsam, poate produce opacizarea preparatului (Chupp, 1941). Fleming & Smith (1944) consideră că la această metodă tratamentul termic este prea drastic. Kohlmeyer & Kohlmeyer (1972) modifică metoda în felul următor (fig. 18 *C*) : Lamela cea mare se fixează provizoriu pe lamă, prin depunerea cu un ac, pe două din laturile lamelei, a două picături minuscule de apă distilată. Se pune în centrul lamelei o picătură de apă distilată, materialul, și deasupra o lamelă mică. Materialul astfel montat poate fi examinat în lumină transmisă, contrast de fază, imersie etc. După examinare se pune o picătură de glicerină la marginea lamelei mici și preparatul se păstrează, ferit de praf, cel puțin o săptămînă, pentru ca apa să se evapore și să fie înlocuită de glicerină. Se etanșează cele două lamele cu un strat de lac de unghii sau Glyceel și se mai păstrează o zi. Se desprinde lamela cea mare de pe lamă cu ajutorul unui ac ascuțit sau cu o lamă, se întoarce cu lamela mică în jos, și se așază peste o picătură mare de balsam sintetic „Caedax" pusă pe lamă.

3.5.2. Preparate în medii care se solidifică

Mediile care se solidifică sînt de două feluri : unele miscibile cu apa, în care materialul poate fi transferat direct, și unele nemiscibile cu apa, în care materialul poate fi montat numai după o deshidratare prealabilă. Primele sînt mult mai potrivite pentru majoritatea ciupercilor. Aceste medii sînt folosite pentru preparate semipermanente și, în general, nu necesită etanșarea preparatului.

A. Medii cu rășini naturale

1) *Guma arabică* (Hoyer)

	I	II	III	IV	V
Gumă arabică	15 g	20 g	20 g	30 g	8 g
Cloral hidrat	100 g	20 g	10 g	50 g	75 g
Glicerină	10 g	20 g	3 ml	20 ml	—
Dextroză	—	—	10 g	—	5 ml (sirop)
Glucoză (sirop)	—	3 ml	—	—	—
Fucsină bazică (0,3 g în 10 ml alcool 95%)	—	10 picături	—	—	—
Acid acetic glacial	—	—	—	—	3 ml
Apă distilată	25 ml	35 ml	30 ml	50 ml	10 ml

Se înmoaie guma arabică în apă timp de 24 ore. Se adaugă cloral hidratul și se lasă cîteva zile să se dizolve, după care se adaugă glicerina. Soluția, care are un indice de refracție ridicat, nu trebuie încălzită înainte de folosire.

I. Rețeta tipică a lui Hoyer. După Cunningham (1972) se pot monta materiale hidratate, nu se deteriorează în timp, bulele de aer sînt resorbite, restaurează turgescența țesuturilor și clarifică. Evidențiază unele particularități morfologice ca porii de la *Uredinales* etc. După Martin & Alexopoulos (1969) mediul Hoyer se deshidratează după 2—3 ani și preparatele trebuie refăcute. Pentru montarea *Myxomycetelor* și *Ascomycetelor*, Alexopoulos & Beneke (1968) recomandă umectarea materialelor în alcool absolut 1 minut, tratarea cu o soluție de KOH 2% tot un minut, spălare în alcool 70% și apoi montarea.

II. Modificare făcută de Doetschman (Cunningham, 1972) este indicată pentru montarea permanentă a ciupercilor hialine.

III. Rețetă propusă de Thirumalachar & Narasimhan (1953) care recomandă, după montarea preparatului, păstrarea acestuia 48 ore la 40—45° și apoi „lutarea" cu un strat de balsam de Canada.

IV. Formula lui G. Faure (Langeron, 1949).

V. Propus de Berlese (Gray, 1958). Se amestecă apa, acidul și siropul de dextroză și apoi se dizolvă guma arabică în acest amestec. Dizolvarea gumei durează o săptămînă sau mai mult și în acest timp se amestecă din cînd în cînd. După dizolvare se adaugă cloral hidratul și se amestecă din nou.

Isaac (1958) propune un mediu care asigură și colorarea. La 10 ml din soluție se adaugă verde metil în exces. Culoarea inițială roșie-purpurie se schimbă în albastru-negru, o dată cu evaporarea acidului formic. Preparatele au permanență mare; nu s-au observat semne de deteriorare după 2 ani de păstrare la temperatura camerei. Indicații asupra preparării acestui mediu sînt date și de Tuite (1969 : 212).

Apă distilată	50 ml
Acid formic (85—90%)	10 ml
Gumă arabică	20 g
Hematoxilină	0,5 g
Alaun de fier	1,5 g
Alaun de crom	0,5 g
Brun Bismarck	0,15 g
Glicerină	20 ml
Cloral hidrat	30 g

Alte medii cu gumă arabică, mai puțin folosite, au fost descrise de Farrant (Gray, 1958) și Lee (DeLamater, 1948).

2) *Balsamul de Canada* este folosit extensiv la montarea secțiunilor obținute la microtom din țesuturile incluse în parafină (vezi 3.3.2. pentru indicații bibliografice). În ultima vreme este înlocuit de un balsam similar, sintetic. Steyaert (1946) propune următoarea metodă pentru montarea în balsam a secțiunilor de mînă sau a ciupercilor prelevate de pe diferite substraturi : Se examinează materialul montat între lamă și lamelă în lactofenol sau alt mediu hidratat. Se pune pe lamă, lîngă lamelă, o picătură de cloral-fenol (amestec în părți egale, per greutate, de cloral hidrat și fenol cristalizat). Se absoarbe mediul hidratat cu hîrtie de filtru, așezată pe latura opusă a lamelei, astfel încît să fie înlocuit de cloral-fenol. Se încălzește ușor pentru eliminarea bulelor de aer și se repetă operația pînă se elimină toată apa. Se pune o picătură

 de balsam dizolvat în xilol, lîngă lamelă, și se repetă procedeul îndepărtînd de data aceasta cloral-fenolul. Se încălzește mai energic preparatul pentru evaporarea cloral-fenolului, se adaugă balsam pe măsură ce se evaporă xilolul și apoi se înlocuiește cu balsam pur. Miceliile și conidiile hialine nu sînt vizibile în preparatele obținute în acest mod și, deseori, sporii sau conidiile se detașează și se pierd, fiind antrenate de migrarea soluțiilor de montare.

B. **Medii cu rășini sintetice**

1) *Alcool polivinilic* Gray & Wess (Gray, 1958). Se amestecă alcoolul polivinilic cu acetona pînă se face o pastă. Se adaugă 5 ml apă, glicerina, acidul lactic și se amestecă. Se amestecă și se adaugă, picătură cu picătură, restul de 5 ml apă. Soluția este opacă la început dar devine transparentă după ce se încălzește pe o baie de apă, timp de 10 minute. Mediul se întărește destul de repede și are indicele de refracție scăzut.

Alcool polivinilic	2 g
Acetonă 70%	7 ml
Glicerină	5 ml
Acid lactic	5 ml
Apă distilată	10 ml

Gurr modificat de Carmichael (comunicare personală). Se încălzește alcoolul în apă, pe o baie, la 55°, amestecînd continuu cu o baghetă de sticlă. Se adaugă acidul lactic și se transferă pe o baie care fierbe. Se amestecă din cînd în cînd pînă se obține o soluție siropoasă, clară. Se poate amesteca în părți egale cu lacto-fucsină pentru a obține, într-o singură operație, colorarea și montarea (Carmichael, 1955).

Alcool polivinilic (granule)	10 ml
Apă distilată	20 ml
Acid lactic 85%	80 ml

2) *Rășini Epon.* Ores (1971) recomandă folosirea rășinilor Epon, în felul următor : Se prepară o soluție (A) care conține 62 ml Epon 812 și 100 ml anhidridă dodecilsuccinică (Epon hardener DDSA) și o soluție (B) din 100 ml Epon 812 și 89 ml anhidridă endometilen tetrahidroftalică (Epon hardener MNA). Reactivii, care se păstrează la 5°, se aduc la temperatura camerei înainte de folosire. Se prepară soluțiile A și B și se amestecă în părți egale. La fiecare 10 ml de amestec se adaugă 0,15 ml 2, 4, 6-tri(dimetilaminometil) fenol (DMP-30). Se omogenizează cu agitator magnetic și apoi se lasă în repaus pentru eliminarea bulelor de aer. Se utilizează pe loc sau se poate păstra cîteva luni la —40 pînă la —50°. Înainte de montare materialul trebuie deshidratat. În cazul culturilor de ciuperci se colorează cu bleu coton în lactofenol, sau alt colorant, se îndepărtează lactofenolul cu ajutorul hîrtiei de filtru sau sugativă și se pune materialul pe o lamă microscopică. Deasupra se pun 1—2 picături de rășină și se acoperă cu lamela, evitîndu-se încorporarea de bule de aer. Pentru solidificare se păstrează în etuvă, la 60°, timp de 10—12 ore. După Ores (1971) preparatele realizate în acest mod se păstrează practic nelimitat, materialul nu se contractă, iar diferiți compuși solubili din țesuturi nu sînt eliminați în mediul de montare.

3) *Alte rășini.* Groat (1939) a propus utilizarea unor polimeri ciclo-parafinici solubili în toluen și cu indicele de refracție 1,54—1,56, denumiți comercial „Nevilite" și „Clarite" iar Minami & al. (1967) o altă rășină „Harleco". De asemenea, pentru montarea materialelor, după o deshidratare prealabilă, se utilizează frecvent „Euparal".

C. Alte substanțe

1) *Glicerina gelatinată* (după K o c h, 1968). Se dizolvă gelatina în apă, pe o baie, la 35°. Se adaugă glicerina și fenolul, care a fost în prealabil dizolvat într-o picătură de apă. Se filtrează soluția caldă prin vată de sticlă sau mătase și se păstrează în flacoane cu deschidere largă. Nu trebuie agitată cînd este fluidă deoarece bulele de aer se elimină foarte greu. Pentru montare, se pune pe lamă un fragment de glicerină gelatinată, se încălzește pînă devine fluidă, se introduce materialul și se acoperă cu lamelă. Poate fi eventual etanșat cu lac pentru unghii sau Glyceel. Materialele pot fi transferate direct din apă în glicerina gelatinată, dar este mai indicat să fie trecute mai întîi în glicerină pură sau lactofenol (L a n g e r o n, 1949). După D a d e (1960a) are un indice de refracție prea mic (1,47) și nu are avantaje față de glicerină sau lactofenol. M a r t i n & A l e x o p o u l o s (1969) consideră că pentru *Myxomycetes* este mai bună decît glicerina.

Gelatină	5 g
Glicerină	35 ml
Apă distilată	30 ml
Fenol	5 g

2) *Wallerite* (D a d e & W a l l e r, 1949). Se dizolvă fenolul în acid acetic la rece. Se adaugă gelatina și se lasă să se dizolve aproximativ două zile. Se adaugă 10 picături de glicerină și se amestecă. Se păstrează în sticle brune și poate fi diluat cu acid acetic glacial. Se întărește în 24 ore. Materialele hidratate trebuie deshidratate în prealabil, în acid acetic glacial, timp de cîteva minute.

Gelatină	10 g
Fenol cristalizat	28 g
Acid acetic glacial	28 ml

3) *Karo* este un amestec de dextroză, dextrină și maltoză, care poate înlocui glicerina gelatinată. Materialele se pot monta direct din apă sau soluții slab alcoolice (A l t m a n, 1966). Indexul de refracție este favorabil pentru examinarea microscopică (M a r d s e n, 1952).

3.6. Metode pentru observarea creșterii și morfogenezei

Pentru studierea unor procese ca germinația, creșterea și ramificarea hifelor, interacțiunea dintre hife, sporogeneza etc., este necesară urmărirea, pe o perioadă mai mare de timp, a ciupercilor care se dezvoltă în culturi, pe medii, și înregistrarea fazei sau fazelor dorite prin descriere, fotografiere și obținerea unor preparate provizorii sau semipermanente.

3.6.1. Culturi pe suporturi transparente

Cea mai simplă metodă constă în plasarea unei lamele sterile pe suprafața mediului, foarte aproape de colonia activă. Miceliul va crește peste lamelă, care poate fi apoi ridicată și examinată la microscop sau, mai bine, răsturnată pe o lamă peste o picătură de lactofenol sau alt lichid de montare (B o o t h, 1971).

În locul lamelelor se pot folosi bucăți pătrate de celofan subțire (20 μm) de dimensiunea lamelelor sau mai mici, sterilizate în autoclav, într-un vas Petri, între hîrtii de filtru. După sterilizare se înmoaie în apă sterilă și se întind pe suprafața mediului nutritiv agarizat. Inoculul se depune în mijlocul peliculei de celofan și, la diferite intervale, se poate examina ciuperca prin ridicarea peliculei și montarea — precedentă eventual de

colorare — într-un lichid de montare, cu sau fără lamelă (Fleming & Smith, 1944; Carmichael, 1956; Isaac, 1964; Gagnon, 1966). Booth (1971) recomandă folosirea celofanului pentru dializă iar Pavlatou & al. (1969) a foliilor de polietilenă.

3.6.2. Culturi în „picătură suspendată"

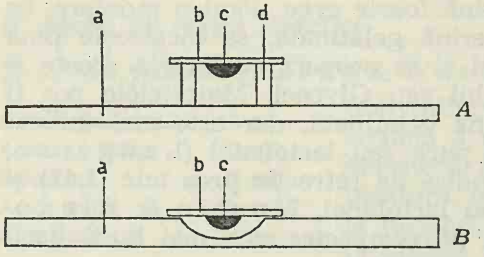


Fig. 19 — Culturi în „picătură suspendată". *A* — celulă van Tieghem; *B* — Lamă cu excavație: *a* — lamă; *b* — lamelă; *c* — mediul sau lichidul inoculat; *d* — suportul (cilindru sticlă) lamelei.

Într-o picătură de apă sau mediu nutritiv, așezat pe o lamelă sterilizată, se depun spori sau micelii. Lamela se răstoarnă și se lipește cu vaselină deasupra excavației unei lame (fig. 19, *B*) sau celule Van Tieghem (fig. 19, *A*). Lama astfel preparată se introduce într-o cameră umedă (vezi pag. 75). Güssow (1918) nu pune pe lamelă mediu lichid ci un fragment dintr-o lamelă, care a fost în prealabil înmuiată în mediu agarizat. Dezvoltarea ciupercii poate fi urmărită prin observații la microscop și la momentul dorit se poate obține un preparat permanent prin detașarea lamelei, deshidratarea la aer și apoi așezarea, peste o picătură de lichid de montare, pe o lamă (Bakerspigel, 1954).

3.6.3. Culturi pe lame și lamele

A. **Metoda „Ridell"** (fig 20) imaginată de fapt de J. T. Duncan (Smith, 1971), descrisă de Ridell (1950) și modificată de Taschdjan (1954) și Anthony & Walkes (1962):

1. Se toarnă într-un vas Petri, mediul glicerină-agar (1 g agar și 5 ml glicerină la 100 ml apă distilată), topit la 50°, astfel încît să se obțină un strat de 5—6 mm grosime.

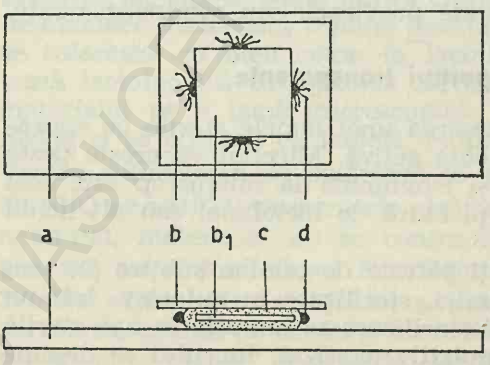


Fig. 20 — Culturi pe lame și lamele, metoda „Ridell".

2. După răcire, pe suprafața mediului, se așază una sau mai multe lame sterilizate.

3. Cu o pensă se ia o lamelă (b_1) de 12 × 12 mm, păstrată în alcool 95%, se elimină excesul de alcool prin atingerea marginii lamelei de o hîrtie de filtru, se flambează, apoi se cufundă în mediu nutritiv menținut aproape de temperatura de fierbere și se transferă în centrul uneia din lamele (*a*) așezate pe mediul din vasul Petri.

4. Pe fiecare latură a lamelei acoperite cu mediu (*c*) se inoculează ciuperca de studiat (*d*).

5. Deasupra lamelei astfel preparate se așază o altă lamelă (*b*), de 22 × 22 mm, sterilizată în același mod.

6. Se urmărește creșterea ciupercii și, înainte ca miceliul și fructificațiile să depășească limitele lamelei mari, aceasta se ridică de pe preparat, fără a fi deplasată lateral. Lamela de 12 × 12 mm se desprinde în același mod de pe lamă. Pe lamela mare și pe lamă vor rămîne porțiuni din miceliu și fructificațiile ciupercii. Pentru obținerea unor preparate microscopice, se pune pe lamelă și pe lamă cîte o picătură de alcool 95% și, înainte ca alcoolul să se evapore complet, se adaugă o picătură de lactofenol sau alt lichid de montare, care poate conține un colorant. Prin așezarea lamelei de 22 mm pe o lamă curată, și a unei lamele curate peste lama cu fructificații, se obțin două preparate, care pot fi etanșate cu lac pentru unghii sau Glyceel.

Pentru obținerea unor preparate semipermanente, Skerman & Dementjewa (1953) recomandă ca după uscare să se pipeteze pe material două picături din soluția: 75 ml eter și 25 ml alcool absolut, pentru eliminarea aerului, și apoi, imediat, două picături din soluția de celoidină 1% în amestec de 75 ml eter și 25 ml alcool absolut, ceea ce permite montarea și colorarea în lactofenol cu bleu coton.

Metode similare, care se deosebesc în principal prin folosirea unor porțiuni de mediu agarizat, inoculat, sau provenind din culturi crescute în vase Petri, au fost descrise de Talbot (1945) și Zoberi (1967). Ciferi (1929) cultivă ciupercile pe lamele acoperite cu mediu, puse în camere umede formate din eprubete cu vată și hîrtie de filtru umectate, iar apoi montează lamela în balsam de Canada după metoda dublei lamele.

B. **Dade** (1960 b) descrie o metodă prin care se obține creșterea ciupercii în centrul lamelei și se asigură păstrarea culturii în stare activă un timp mai îndelungat.

Se toarnă mediul în vas Petri. După solidificare se împarte în patru, prin două secțiuni perpendiculare una pe alta, făcute cu un bisturiu sterilizat (fig. 21). Se ridică fiecare colț și se introduce cîte o lamelă sterilizată (A). Se răstoarnă placa și pe spate se marchează cu dermatograf locul celor 4 lamele (B), prin pătrate mai mici decît lamelele. Se taie porțiunea pătrată din mijlocul lamelelor și se îndepărtează agarul (C). Se inoculează și se incubează. Ciuperca crește pe mediu și pe suprafața lamelei, poate fi examinată la binocular sau microscop și, la momentul dorit, se îndepărtează agarul (D) iar lamelele purtînd fructificațiile se recuperează și se montează ca preparate microscopice.

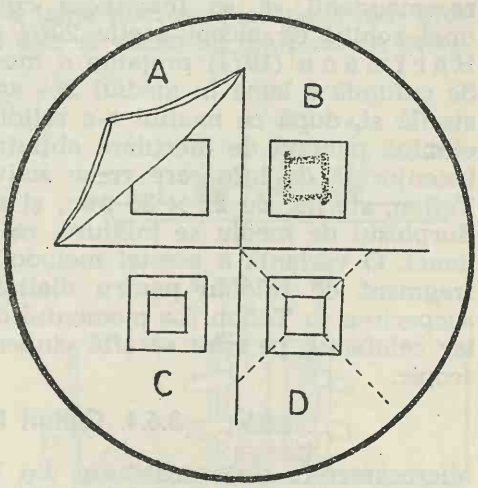


Fig. 21 — Culturi pe lamele (după Dade, 1960 b)

C. **Metoda lamelor gelozate** (Rivalier, 1934)

1. În vase Petri cu diametru convenabil se introduce o baghetă de sticlă în formă de U pe care se așază o lamă microscopică. Se sterilizează totul în etuvă.

2. Cu ajutorul unei pense flambate se cufundă lama într-un pahar Borrel care conține mediu nutritiv agarizat, topit la 60°, și apoi se așază la loc, pe baghetă, în vasul Petri.

3. Cu o pipetă se introduc în fiecare vas Petri 2—3 ml apă sterilă.

4. Se inoculează pelicula de mediu depusă pe lamă și se incubează.

5. Se analizează la microscop cu un obiectiv slab și, la momentul dorit, se poate obține un preparat microscopic în felul următor: Se îndepărtează mediul de pe lamă cu excepția unei porțiuni pătrate care conține colonia ciupercii. Se deshidratează la 37° ținînd lama cu cultura în jos pentru a evita depunerea de praf. Pentru fixare se imersează în soluția: 1 parte colodiu, 2 părți alcool absolut și 2 părți eter, după care se lasă să se usuce. După cîteva ore se poate colora cu bleu coton sau alt colorant, timp de 10 minute, se spală bine cu apă de robinet, se trece lama prin alcool 70%, apoi 90%, alcool absolut, acetonă, xilol și se montează în balsam.

Pentru a elimina inconvenientul infestării destul de frecvente și deshidratării, Luteraan & Guyotjeannin (1952) propun următoarea modificare: Într-un cilindru de sticlă cu fund plat, înalt de 15 cm și cu diametrul de minimum 40 mm, se plasează patru lame care vor constitui un paralelipiped. Tubul se închide cu un dop de vată învelit în tifon și se sterilizează în autoclav. Se toarnă în tub mediul dorit pînă la înălțimea de 1—1,5 cm. Se sterilizează din nou. La scoaterea din autoclav, în timpul răcirii, se înclină și se rotește tubul astfel ca pe lame să se așeze un strat de mediu. Pentru inocularea lamelor se procedează ca la însămînțarea eprubetelor cu mediu. După incubare, la momentul ales, se scot lamele, se lasă să se usuce și se procedează ca la metoda standard. În cazul ciupercilor patogene este recomandabil să se inactiveze culturile prin introducerea în tub a unei soluții de alcool acetic 20%, timp de 10 minute.

Hartmann (1971) propune o modificare a metodei lamelor gelozate: Se cufundă o lamă în mediul 2% agar, topit, se pune în cameră umedă, sterilă și, după ce mediul s-a solidificat, se inoculează. După 24 ore se elimină punctul de inoculare obținîndu-se astfel în mediu o depresiune, înconjurată de hife care cresc activ. Se așază peste mediu o foaie de Teflon, sterilă, de 22 × 35 mm, și se lipește de lamă la ambele capete. Surplusul de mediu se înlătură, ca și mediul de pe partea inferioară a lamei. O variantă a acestei metode constă în așezarea pe mediu a unui fragment de celofan pentru dializă, inoculare cu ciuperca în studiu, acoperirea cu Teflon. La momentul dorit se înlătură membrana de Teflon iar celofanul, pe care se află ciuperca, se montează ca preparat microscopic.

3.6.4. Culturi în microcamere

Microcamerele sînt constituite din lamele, fixate pe lame microscopice prin diferiți suporți, astfel încît între ele să rămînă un spațiu mai mult sau mai puțin închis, în care se introduce mediul de cultură inoculat. Ciupercile se dezvoltă la limita dintre mediu și lamelă și pot fi exami-

nate, în special în zonele de contact cu lamela, chiar cu un obiectiv cu imersie. Microcamerele reprezintă o perfecționare a tehnicilor de cultură pe lame și lamele, asigurînd prelungirea timpului de observare prin reducerea deshidratării și permițînd examinarea periodică la microscop și fotografierea, fără pericol de infestare.

Pentru incubare se introduc în „camere umede" preparate în felul următor : Într-un vas Petri cu diametrul de minimum 9 cm se pun cîteva discuri de hîrtie de filtru și o baghetă de sticlă în formă de U, care va servi drept suport pentru microcameră. Se sterilizează în etuvă și apoi se umectează hîrtia cu o soluție apoasă de glicerină 20—50%. Se va evita folosirea apei deoarece se condensează pe pereții interiori. Montarea microcamerei, introducerea mediului, însămînțarea și așezarea pe suport în camera umedă, trebuie executate în condiții de sterilitate, de preferință sub o hotă. Pentru examinare, microcamerele pot fi scoase, temporar, din camera umedă.

A. **Malan** (1955) (fig. 22 *A*). Dintr-o lamelă microscopică se taie două baghete de 24—25 × 4 mm (*e*), care se fixează cu ajutorul balsamului de Canada pe o lamă *(a)* la distanță convenabilă în funcție de lamela care va acoperi microcamera. Se pune o picătură de alcool în spațiul dintre baghete, se lasă să se evapore și se flambează. Se sterilizează în același mod o lamelă *(b)* și se așază cu partea sterilizată peste baghete. Se ridică lamela dintr-o parte și se introduce o porțiune mică de mediu proaspăt, inoculat *(c)*. Se apasă lamela pînă atinge baghetele și se incubează în cameră umedă.

B. **Macdonald** (1948) (fig. 22 *B*) confecționează o ramă (*e*), din alamă, cu dimensiunile potrivite pentru a susține o lamelă de 20 × 50 mm. Rama se așază pe o lamă microscopică subțire *(a)* și deasupra se pune lamela *(b)*. Se introduce în camera umedă și se sterilizează totul în etuvă. Se pune pe lamelă un strat de mediu (*c*) turnat și solidificat în prealabil într-un vas Petri și se însămînțează. Se răstoarnă lamela cu mediul în jos, se umectează hîrtia din camera umedă, și se incubează.

C. **Shoemaker** (1950) (fig. 22 *C*). Într-o lamă microscopică de 3 mm grosime *(a)* se taie un șanț *(f)* lat de 12 mm și adînc de 0,8 mm. Se steri-

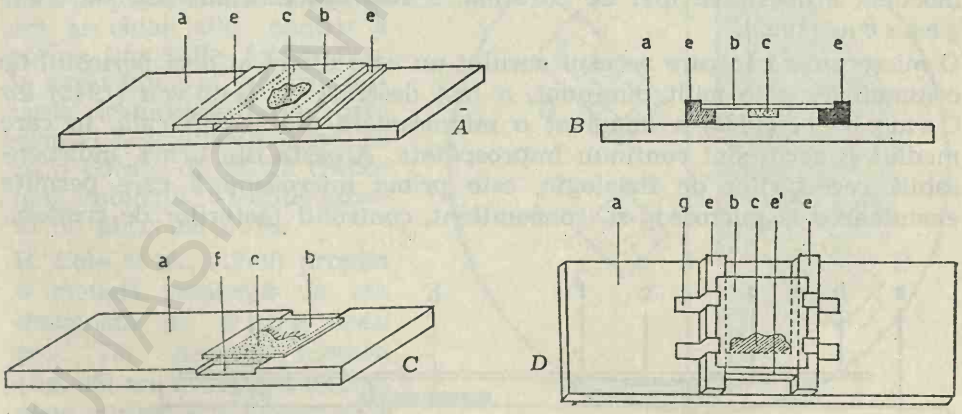


Fig. 22 — Microcamere pentru cultură :

A — redesenat după Malan, 1955 ; *B* — desenat după explicațiile lui Macdonald, 1948 ; *C* — după Shoemaker, 1950 ; *D* — după Reiss, 1970

lizează separat lama și o lamelă de 18 mm. Lamela *(b)* se așază peste șanț, fără a folosi vreun adeziv. Agar topit, inoculat *(c)*, se introduce sub lamelă, pînă ce umple o parte din spațiu. Se incubează în cameră umedă.

D. **Reiss** (1970) (fig. 22 *D*). Pe o lamă microscopică (*a*) se atașează cu un adeziv netoxic două baghete de sticlă *(e)*, de grosimea lamei, la distanță de 14 mm una de alta, și se sterilizează. O lamelă sterilă de 18 mm *(b)* se așază deasupra baghetelor și se fixează cu bandă adezivă *(g)*. O mică porțiune dintr-o cultură *(c)* obținută în vas Petri, se transferă steril în spațiul dintre lamelă și lamă. Se împinge mediul cu o baghetă de sticlă de aceeași grosime, lungă de 14 mm *(e^1)*, astfel încît să se închidă spațiul la un capăt. Microcamera astfel preparată se introduce într-o cameră umedă mai înaltă, în poziție verticală. Se analizează periodic și, la momentul dorit, se pot obține două preparate microscopice, care conțin fructificațiile ciupercii dezvoltate pe lamă și lamelă.

E. **Madelin** (1969) propune o microcameră perfecționată, etanșă, la care unele dezavantaje — apariția picăturilor de apă de condensare pe lamelă, schimbarea umidității relative etc. — sînt înlăturate (fig. 23). Se sterilizează lame de 76 × 25 mm și lamele de 50 × 22 mm. Cu o seringă se aplică pe lamă (*a*) un strat îngust de vaselină (*e*), de formă dreptunghiulară, de 40 × 22 mm. Pe lamelă *(b)* se pune o picătură de 5 mm diametru de mediu agarizat *(c)* la distanța de 17 mm de capătul lamelei. Se inoculează agarul. Se pune peste picătura de agar una sau două picături de ulei de parafină, steril *(f)*. Se acoperă uleiul și agarul cu un pătrat de celofan de 16 mm, sau polietilenă (*g*), care au fost sterilizate prin imersie în apă fierbinte. Se va evita includerea de picături de apă sau bule de aer sub membrană. Se pune un pătrat de 13 mm de hîrtie de filtru umedă *(h)*, în cealaltă parte a lamei. Se răstoarnă lamela și se presează ușor peste dreptunghiul de vaselină, astfel încît să rămînă un spațiu de 1 mm între lamă și lamelă iar membrana să nu atingă lama.

O microcameră similară, folosită pentru studierea anastomozării miceliilor, confecționată dintr-o lamă cu excavații în care se pune mediul inoculat, acoperit cu ulei de parafină, a fost descrisă anterior de J ø r g e n s e n (1955).

O microcameră în care accesul aerului nu este direct și deci pericolul de contaminare este mult diminuat, a fost descrisă de B r o w n (1942) iar C a m p b e l l (1968) a imaginat o microcameră mai complicată, în care mediul și aerul sînt continuu împrospătate. Aceasta din urmă, indispensabilă cercetărilor de fiziologie, este prima microcameră care permite examinarea la microscop și, concomitent, controlul factorilor de creștere.

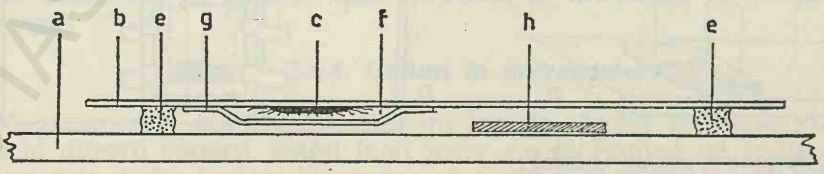


 Fig. 23 — Microcameră etanșă (după M a d e l i n, 1969)

3.6.5. Microcamere pentru examinarea continuă a conidiogenezei

Aceste microcamere nu se deosebesc esențial de cele descrise în subcapitolul anterior (3.6.4.), dar au fost utilizate pentru înregistrarea fotografică succesivă („time lapse"), a fazelor ontogeniei conidiilor la unele ciuperci, în special la *Hyphomycetes*. Înregistrarea se poate face prin fotografiere cu aparate obișnuite atașate microscopului sau cu aparate de filmat, prevăzute cu dispozitive de declanșare automată, la diferite intervale.

A. **Cole & Kendrick** (1968) (fig. 24). Într-o lamă de sticlă cu dimensiunile 75 × 50 mm *(a)* se taie un orificiu de 18—20 mm diametru și un canal de 1 mm lățime și 35—45 mm lungime, care face legătura între orificiu și marginea lamei. Lama se sterilizează în autoclav și apoi o lamelă sterilă de 60 × 24 mm *(b′)*, este lipită pe o parte a lamei, cu lac de unghii, astfel încît să acopere orificiul și canalul. Se expune la UV timp de 15 minute. O bucată de carton subțire, sterilizat, de lungimea diametrului orificiului și lățimea de 5 mm, este așezat în orificiu, paralel cu axa scurtă a lamei. Cu o micropipetă sterilă se injectează mediu nutritiv agarizat *(c)*, în jumătatea orificiului opusă canalului. Cartonul este îndepărtat și suprafața verticală a mediului este inoculată. Se fixează, tot cu lac de unghii, o a doua lamelă de 60 × 24 mm *(b)* deasupra orificiului canalului. Microcamera astfel preparată se introduce în camera umedă. Unele ciuperci pot crește și sporula mai mult de 14 zile și microcamera poate fi ținută pe platina microscopului ore și chiar zile, pentru a obține imaginile fotografice. În acest interval, pentru evitarea deshidratării, se poate acoperi deschiderea canalului cu o bucată de hîrtie creponată îmbibată în soluție apoasă de glicerină 50%.

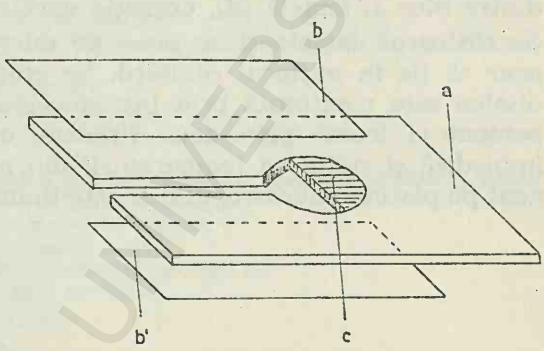


Fig. 24 — Microcameră pentru observarea conidiogenezei (după Cole & Kendrick, 1968)

B. **Cole** & al., (1969) propun o metodă inspirată de cea imaginată de Dade (vezi pag. 73). Această metodă (fig. 25) are avantajul că permite creșterea și examinarea în „time lapse" și a ciupercilor care nu cresc în mod

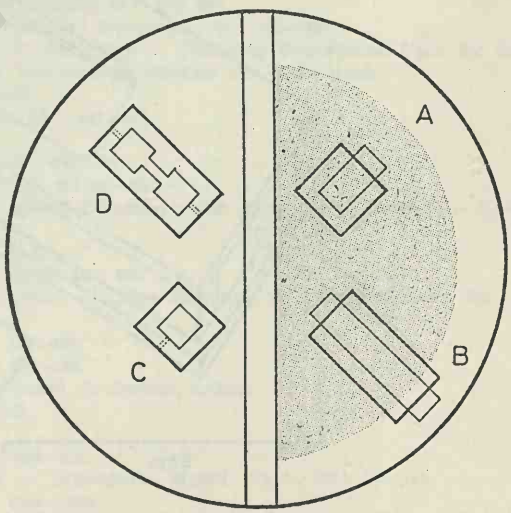


Fig. 25 — Microcameră pentru observarea conidiogenezei (după Cole & al., 1969)

obișnuit în microcamere. Într-un vas Petri din material plastic se toarnă un strat de 2 mm grosime de mediu cartof dextroză-agar sau malţ-agar. Se decupează porţiuni de 24 × 5—10 mm *(A)* sau 64 × 5—10 mm *(B)* din mediul pe care ciuperca a crescut deja și se acoperă cu lamele sterilizate, de 22 × 22 mm sau de 60 × 24 mm, lăsînd spaţii pentru aerisire. Agarul se poate decupa și înainte de inoculare *(C* și *D)*, în spaţiile create se inoculează ciuperca, se pune deasupra lamela și apoi cu un ac steril se fac orificii pentru aerisire. Vasul Petri se fixează pe platina microscopului cu bandă adezivă și capacul poate fi deschis pentru observaţii și fotografiere deoarece contaminanţii nu afectează ciuperca aflată sub lamelă.

C. **Harvey & Wenham** (1971) au construit o microcameră din plexiglass (fig. 26). Se taie un bloc de 1 cm² din mediu agarizat *(c)* și se pune pe o lamelă *(b)* de 40 × 22 mm. Se inoculează la punctele de contact dintre bloc și lamelă *(d)*, operaţia executîndu-se într-un vas Petri steril. Se răstoarnă lamela și se pune pe microcameră *(A)* astfel ca blocul de agar să fie în mijlocul cavităţii. Se etanșează lamela cu parafină. Umiditatea este menţinută prin introducerea unui curent de aer umidificat, pompat și trecut prin două flacoane cu apă sterilă. Curentul de aer împiedică și ridicarea temperaturii din microcamera care se află permanent pe platina microscopului și este iluminată continuu.

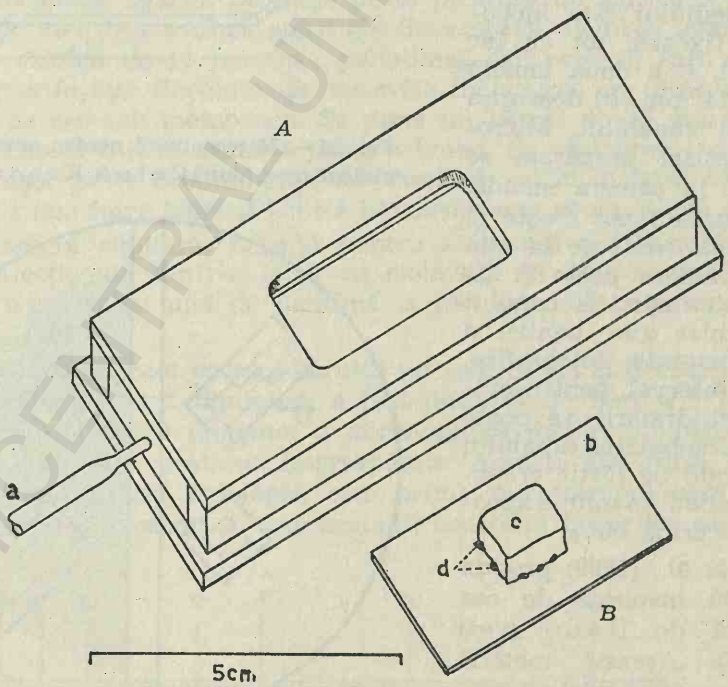


Fig. 26 — Microcameră cu aerisire continuă :
A — microcamera ; *B* — lamela cu mediul inoculat : *a* — tub pentru admisia aerului ; *b* — lamelă ; *c* — mediu ; *d* — inocul (după Harvey & Wenham, 1971)

Bibliografie

ALCORN, G. D. & WORLEY, C. L. (1936) — *Stain Technol.*, 11 : 119—120.

ALEXOPOULOS, C. J. & BENEKE, E. S. (1968) — „Laboratory Manual for Introductory Mycology". Burgess Publ. Co., Minneapolis.

ALTMAN, J. (1966) — „Phytopathological Techniques. Laboratory Manual". Pruett Press. Inc., Boulder.

AMANN, J. (1896) — *Z. wiss. Mikrosk.*, 13 : 18—21.

ANONIM (1968) — „Plant Pathologist's Pocketbook". Commonwealth Mycological Institute, Kew.

ANTHONY, E. H. & WALKES, A. C. (1962) — *Can. J. Microbiol.*, 8 : 929—930.

ANTOINE, H. (1965) — *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 81 : 264—268.

ARMITAGE, F. D. (1944) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 27 : 131—133.

ARTMAN, J. D. (1969) — *Pl. Dis. Reptr*, 53 : 897.

AUBÉ, C. & PELLETIER, G. (1969) — *Phytopathology*, 59 ; 1341.

BAKERSPIGEL, A. (1954) — *Mycologia*, 46 : 523—526.

BARGHOORN, E. S. (1947) — *Science, N. Y.*, 106 : 299—300.

BARRON, G. L. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology". Vol. 4 : 405—427. Academic Press, London & New York.

BELL, F. H. (1951) — *Phytopathology*, 41 : 3.

BENEDEK, T. (1941) — *Chron. Bot.*, 6 : 201—202.

BEVEGE, D. I. (1968) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51 : 808—810.

BISBY, G. R. (1953) — „An Introduction to the Taxonomy and Nomenclature of Fungi". Commonwealth Mycological Institute, Kew.

BOEDIJN, K. B. (1956) — *Stain Technol.*, 31 : 115—116.

BOIDIN, J. (1951) — *C. r. Séanc. Acad. Sci. Paris*, 233 : 824—826.

BOOTH, C. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology". Vol. 4 : 1—47. Academic Press, London & New York.

BOULLARD, B. (1967) — „Les Champignons du Sol. Ecologie, Methodes d'Étude". Rouen.

BRETZ, T. W. & BERRY, F. H. (1964) — *Pl. Dis. Reptr*, 48 : 514.

BROWN, J. H. (1942) — *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 70 : 460—462.

BRUMMELEN, J. van (1967) — *Persoonia*, 1 (supl.) : 1—260.

BUTLER, E. E. & MANN, M. P. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 231—232.

CAMPBELL, R. (1968) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51 : 83—87.

CARMICHAEL, J. W. (1955) — *Mycologia*, 47 : 611.

— (1956) — *Mycologia*, 48 : 450—453.

CHUPP, C. (1940) — *Mycologia*, 32 : 269—270.

— (1941) — *Chron. Bot.*, 6 : 226—227.

CICCARONE, A. (1946) — *Nuovo G. bot. ital.*, 53 : 353.

CIFERRI, R. (1929) — *Mycologia*, 21 : 151—154.

COLE, G. T. & KENDRICK, W. B. (1968) — *Mycologia*, 60 : 340—344.

—, NAG RAJ, T. R. & KENDRICK, W. B. (1969) — *Mycologia*, 61 : 726—730.

CONN, H. J., DARROW, M. A. & EMMEL, V. M. (1962) — „Staining Procedures Used by the Biological Stain Commission". Ed. 2, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

COVERT, S. V. (1956) — *Mycologia*, 48 : 448—450.

CUNNINGHAM, J. L. (1969) — *Stain Technol.*, 44 : 243—246.

— (1972) — *Mycologia*, 64 : 906—911.

— & HAGEDORN, D. J. (1961) — *Mycologia*, 52 : 652—654.

DADE, H. A. (1960*a*) — *J. Quekett microsc. Club*, 5 : 308—317.

— (1960*b*) — In „Herb. I.M.I. Handbook". p. 40—69. Commonwealth Mycological Institute — Kew.

— (1963) — *Vict. Nat.*, 85 : 41—47.

— & WALLER, S. (1949) — *Mycol. Pap.*, 27 : 1—5.

DAFT, G. C. & LEBEN, C. (1966) — *Pl. Dis. Reptr*, 50 : 493.

DARLINGTON, C. D. & LA COUR, L. F. (1962) — „The Handling of Chromosomes". Ed. 4. George Allen & Unwin Ltd., London.

DAVIS, W. H. (1922) — *Phytopathology*, 12 : 492—494.

DeLAMATER, E. D. (1948) — *Mycologia*, 40 : 423—429.

DENNIS, R. W. G. (1968) — „British Ascomycetes". J. Cramer, Lehre.

DIEHL, W. W. (1929) — *Science, N. Y.*, 69 : 276.

— (1940) — *Mycologia*, 32 : 570—571.

DIENER, U. L. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 654—658.

DISBREY, B. D. & WATLING, R. (1967) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 32 : 81—114.

DRAKE, C. R. (1963) — *Phytopathology*, 53 : 1094—1099.

DRANDAREVSKI, C. & WELTZIEN, H. C. (1966) — *Naturwissenschaften*, 53 : 616—617.

DRING, D. M. (1971) — In Booth. C. (Ed.). „Methods in Microbiology". Vol. 4 : 95—111. Academic Press, London & New York.

DUDDINGTON, C. L. & DIXON, S. M. (1951) — *Nature, Lond.*, 168 : 38.
DURAND, E. J. (1911) — *Phytopathology*, 1 : 129—130.
ELLIS, M. B. (1950) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 33 : 22.
— (1960) — In „Herb. I.M.I. Handbook". p. 24—36. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
ENDE, G. van den (1951) — *Tijdschr. PlZiekt.*, 57 : 130—132.
ENDO, R. M. (1966) — *Mycologia*, 58 : 655—659.
EVLAHOVA, A. A. & VORONINA, E. G. (1970) — *Mykrobiologiya*, 39 : 118—119.
FARRIS, S. H. (1966) — *Can. J. Bot.*, 44 : 1106—1107.
— (1968) — *Can. J. Bot.*, 46 : 1109—1110.
FAUST, M. A. & PRAMER, D. (1964) — *Nature, Lond.*, 204 : 94—95.
FEDER, N. & O'BRIEN, T. P. (1968) — *Amer. J. Bot.*, 55 : 123—142.
FEDER, W. A. & HUTCHINS, P. C. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 863—864.
FLEMING, A. & SMITH, G. (1944) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 27 : 13—19.
FRAYMOUTH, J. (1956) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 39 : 79—107.
— & HAWKER, L. E. (1952) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 35 : 91.
FRITSCH, P. (1969) — *Arch. klin. exp. Derm.*, 233 : 253—268.
FURTADO, J. S. (1968) — *Mycologia*, 60 : 9—15.
— (1970) — *Mycologia*, 62 : 406—407.
GABE, M. (1968) — „Techniques Histologiques", Masson et Cie., Paris.
GAGNON, C. (1966) — *Stain Technol.*, 41 : 247.
GERDEMANN, J. W. (1955) — *Mycologia*, 47 : 619—632.
GLICK, D. (1949) — „Techniques in Histo-and Cytochemistry". Interscience Publ., Inc., New York.
GOMORI, G. (1952) — „Microscopic Histochemistry". Univ. Chicago Press, Chicago.
GOOS, R. D. & TSCHIRSCH, M. (1963) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 46 : 321—330.
GRAM, K. & JØRGENSEN, E. (1953) — *Friesia*, 4 : 262—266.
GRAY, P. (1958) — „Handbook of Basic Microtechnique". McGraw-Hill, New York, Toronto, London.
GRAY, P. H. H. (1941) — *Can. J. Res. Ser. C.*, 19 : 95—98.
GROAT, R. A. (1939) — *Anat. Rec.*, 74 : 1—6
GROSJEAN, J. (1942) — „Het parasitaire Karakter van eeinge Polyporaceën". Thesis, Univ. Amsterdam.
GROUET, D. (1962) — *Annls Epiphyt.*, 13 : 5—22.
GRUND, D. W. & MARR, C. D. (1965) — *Mycologia*, 57 : 583—587.
GURR, E. (1958) — „Methods of Analytical Histology and Histo-Chemistry". Leonard Hill Ltd., London.
— (1965) — „The Rational Use of Dyes in Biology and General Staining Methods", Leonard Hill Ltd., London.
GUYOTJEANNIN, C. (1950) — *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 66 : 41—42.
GUSSOW, H. T. (1918) — *Phytopathology*, 8 : 447.
HANSFORD, C. G. (1961) — „The *Meliolineae*. A Monograph". *Sydowia*, Beih. 2, 1—806.
HARTMANN, G. C. (1971) — *Stain Technol.*, 46 : 100—101.
HARVEY, I. C. & WENHAM, H. T. (1971) — *N. Z. Jl Bot.*, 9 : 32—38.
HENDERSON, D. M., ORTON, P. D. & WATLING, R. (1969) — British Fungus Flora. Agarics and Boleti : Introduction." H. M. Stationery Office, Edinburgh.
HENDERSON, S. A. & LU, B. C. (1968) — *Stain Technol.*, 43 : 233—236.
HERING, F. T. & NICHOLSON, P. B. (1964) — *Nature, Lond.*, 201 : 942—943.
HOOKER, W. J. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 1126—1129.
HRISTOV, A. (1941) — *Spisk. Zemed. Opit. Inst. Bulg.*, 11 : 13—15.
HUBERT, E. E. (1922) — *Phytopathology*, 2 : 440—441.
HUTCHINSON, W. G. (1936) — *Phytopathology*, 26 : 293—294.
IABLOKOVA, V. A. (1936) — *Zashch. Rast., Leningr.*, 11 : 68—71.
IONIȚĂ. I. (1973) — În „Metode de bio-preparare". p. 31—50. Muz. St. Nat. Ploiești.
ISAAC, P. K. (1958) — *Stain Technol.*, 33 : 261—264.
— (1964) — *Can. J. Microbiol.*, 10 : 621—622.
JENSEN, W. A. (1962) — „Botanical Histochemistry. Principles and Practice". Freeman & Co., San Francisco — London.
JEWELL, F. F. (1958) — *Forest. Sci.*, 4 : 42—44.
JOHANSEN, D. A. (1940) — „Plant Microtechnique". McGraw-Hill, New York.
JØRGENSEN, E. (1955) — *Friesia*, 5 : 75—79.
JOSSERAND, M. (1952) — „La description des champignons supérieurs". P. Lechevalier, Paris.
KELLY, M. S. & GAY, J. L. (1969) — *Arch. Mikrobiol.*, 66 : 1—13.
KERTESZ, Z. I. (1951) — „The Pectic Substances". Interscience Publ. Inc., New York.
KNOX, R. B. (1970) — *Stain Technol.*, 45 : 265—272.
KOCH, F. C. & HANKE, M. E. (1953) — „Practical Methods in Biochemistry". Ed. 6, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

KOCH, W. J. (1968) — „Fungi in the Laboratory". The Book Exchange, Chapel Hill.
KOHLMEYER, J. & KOHLMEYER, E. (1972) — *Mycologia*, 64 : 666—669.
KOO, C. J. (1956) — *Mycologia*, 48 : 288—301.
KORF, R. P. (1952) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 35 : 24—25.
— (1962) — *Mycologia*, 54 : 12—33.
KOTLABA, F. & POUZAR, Z. (1964) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 47 : 653—654.
LAANE, M. M. (1968) — *Z. wiss. Mikrosk.*, 69 : 7—10.
LANGERON, M. (1949) — „Précis de Microscopie". Ed. 7. Masson et Cie., Paris.
LANGERON, M. & VANBREUSEGHEM, R. (1952) — „Précis de Mycologie". Ed. 2. Masson et Cie., Paris.
LaRUE, J. I. (1971) — *Mich. Bot.*, 10 : 89—93.
LATCH, G. C. M. & HANSON, E. W. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 300—315.
LAUNDON, G. F. (1971) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 56 : 317—318.
LEBEN, C. (1952) — *Phytopathology*, 42 : 352.
LEPIK, E. (1928) — *Phytopathology*, 18 : 869—872.
LINDEGREN, C. C. & BEMILLER, P. M. (1969) — *Can. J. Genet. Cytol.*, 11 : 987—992.
LINDER, D. H. (1929) — *Science, N. Y.*, 70 : 430.
LLOYD, A. O. (1965) — *Int. Biodetn Bull.*, 1 : 10—13.
LOQUIN, M. (1951) — *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 67 : 383—386.
— (1952) — *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 68 : 172—174.
LOWRY, R. J. (1963) — *Stain Technol.*, 38 : 199—200.
LUTERAAN, P. J. & GUYOTJEANNIN, C. (1952) — *Revue Mycol.*, 17 : 158—160.
McBRIDE, M. C. (1936) — *Am. J. Bot.*, 23 : 686—688.
MACDONALD, J. A. (1948) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 31 : 92—93.
McKNIGHT, K. H. (1968) — *Mycologia*, 60 : 723—727.
MADELIN, M. F. (1969) — *J. gen. Microbiol.*, 55 : 319—324.
MALAN, C. E. (1955) — *Allionia*, 2 : 295—267.
MARDSEN, D. H. (1952) — *Phytopathology*, 42 : 300.
MARLATT, R. B., LEWIS, R. W. & McKITTRICK, R. T. (1963) — *Pl. Dis. Reptr*, 47 : 126—128.
MARTIN, G. W. & ALEXOPOULOS, C. J. (1969) — „The Myxomycetes". Univ. of Iowa Press, Iowa City.
MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M. (1967) — „Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale". Masson et Cie, Paris.
METROD, G. (1949) — *Revue Mycol.*, 14 : 121—125.
MIHALEVSKAIA, O. B. (1966) — *Bot. Zh. SSSR.*, 51 : 395.
MINAMI, P. S., SCHIMIZU, H., TIBA, Y & MINAI, K. (1967) — *Revta Fac. Farm. Bioquim. S. Paulo*, 5 : 495—501.
MOORE, E. J. (1965) — *Stain Technol.*, 40 : 23—27.
MORGAN-JONES, J. F. & HULTON, R. L. (1973) — *Mycologia*, 65 : 694—697.
MORTON, D. J. (1960) — *Phytopathology*, 50 : 270—272.
. (1961) — *Phytopathology*, 51 : 27—29.
MUNK, A. (1957) — *Dansk Bot. Ark.*, 17 : 1—491.
MUREȘAN, E., GABOREANU, M., BOGDAN, A. T. & BABA, A. I. (1974) — „Tehnici de histologie normală și patologică". Ed. Ceres, București.
NELSON, G. A. & OLSEN, O. A. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 965—968.
NICOLESCU, P. (1952) — În Diaconiță, Gh. & al. „Tehnica histopatologică", p. 65—104. Edit. de Stat pentru Literatură Științifică, București.
NOLL, A. (1949) — *Phytopath. Z.*, 15 : 447—481.
ORES, R. O. (1971) — *Stain Technol.*, 46 : 315—317.
PARKINSON, D., GRAY, T. R. G. & WILLIAMS, S. T. (1971) — „Methods for Studying the Ecology of Soil Micro-organisms". Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburg.
PARRIS, G. K. (1944) — *Phytopathology*, 34 : 700—702.
PAULI, F. (1956) — *Stain Technol.*, 31 : 91—93.
PAVLOTOU, M., KAKLAMANI, E. & MARCELOU, U. (1969) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 39 : 109—112.
PEACOCK, H. A. (1966) — „Elementary Microtechnique". Ed. 3, Edward Arnold, London.
PETERSEN, L. J. (1956) — *Phytopathology*, 46 : 581—582.
PFISTER, D. H. (1970) — *Mycologia*, 62 : 234—237.
PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S. (1970) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 55 : 158—161.
PHINNEY, H. K. & HARDISON, J. R. (1954) — *Mycologia*, 46 : 667—669.
PIGMAN, W. W. & GOEPP. R. M. (1948) — „Chemistry of the Carbohydrates". Academic Press, New York.
POLICARD, A., BESSIS, M. & LOQUIN, M. (1957) — „Traité de Microscopie. Instruments et Techniques". Masson et Cie., Paris.
POPP, W. (1958a) — *Phytopathology*, 48 : 19—22.
— (1958b) — *Phytopathology*, 48 : 641—643.

PURVIS, M. J., COLLIER, D. C. & WALL, D. (1964) — „Laboratory techniques in Botany". Butterworths, London.
RAPILLY, F. (1968) — „Les Techniques de Mycologie en Pathologie Végétale". *Annls Epiphyt.*, 19 (nr. hors série) : 1—102.
RAWLINS, T. E. & TAKAHASHI,, W. N. (1952) — „Techniques of Plant Histochemistry and Virology". The National Press, Milbrae.
REEWE, R. M. (1959) — *Stain Technol.*, 34 : 209—211.
REISS, J. (1969) — *Stain Technol.*, 44 : 5—9.
— (1970) — *J. gen. appl. Microbiol., Tokyo*, 16 : 185—187.
— (1971) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 56 : 481—482.
RIDELL, R. W. (1950) — *Mycologia*, 42 : 265—270.
RIKER, A. J. & RIKER, R. S. (1936) — „Introduction to Research of Plant Diseases". John S. Swift, Co., St. Louis.
RISHBETH, J. (1954) — *Nature, Lond.*, 174 : 361—362.
RIVALIER, E. (1934) — *Annls Derm.*, Ser. 7, 5 : 780—786.
ROGERS, J. D. (1965) — *Phytopathology*, 55 : 246.
ROMEIS, B. (1968) — „Mikroskopische Technik" Ed. 16. R. Oldenbourg, München-Wien.
ROTH, J. N. & BRANDT, W. H. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 363—364.
SACKSTON, W. E. (1954) — *Phytopathology*, 44 : 106—107.
SASS, J. E. (1951) — „Botanical Microtechnique". Ed. 2. Iowa State College Press.
SAVILE, D. B. O. (1946) — *Stain Technol.*, 21 : 99—102.
— (1971) — *J. Indian bot. Soc.*, 50A : 41—51.
SEGALL, R. H. & NEWHALL, A. G. (1960) — *Phytopathology*, 50 : 76—82.
SHIPTON, W. A. & BROWN, J. F. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 1313.
SHOEMAKER, R. A. (1964) — *Stain Technol.*, 39 : 120—121.
SHOEMAKER, R. N. (1950) — *Science, N. Y.*, 112 : 53.
SILVA, E. M. de (1965) — *Stain Technol.*, 40 : 253—257.
SILVERMAN, W. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 531—532.
SIMMONS, S. A. & SHOEMAKER, R. A. (1952) — *Stain Technol.*, 27 : 121.
SIMMS, H. R. (1965) — *Mycologia*, 57 : 833—834.
SINGH, P. (1969) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 37 : 142—144.
SKALICKÝ, V. & JECHOVÁ, V. (1964) — *Biologia Pl.*, 6 : 57—65.
SKERMAN, V. B. D. (1946) — *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 24 : 319—320.
— & DEMENTJEWA, G. (1953) — *Aust. J. Sci.*, 15 : 218.
SKVORȚOV, S. S. (1937) — *Zashch. Rast., Leningr.*, 15 : 90—91.
SMITH, A. H. (1965) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 26 : 385—402.
SMITH, G. (1971) — „An Introduction to Industrial Mycology". Ed. 6. Edward Arnold, London.
STEVENS, F. L. (1916*a*) — *Phytopathology*, 6 : 112.
— (1916*b*). *Phytopathology*, 6 : 367—368.
STEYAERT, R. L. (1946) — *Parasitica*, 2 : 137—138.
STOCKDALE, P. M. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology". Vol. 4 : 429—460. Academic Press, London & New York.
TALBOT, P. H. B. (1945) — *Nature, Lond.*, 156 : 391—392.
TASCHDJIAN, C. L. (1954) — *Mycologia*, 46 : 681—683.
THIRUMALACHAR, M. J. & NARASIMHAN, M. J. (1953) — *Mycologia*, 45 : 461—468.
THOMAS, R. C. (1928) — *Am. J. Bot.*, 15 : 537—547.
— (1930) — *Ohio J. Sci.*, 42 : 60—62.
TRIBE, H. T. (1972) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58 : 341.
TSCHUDY, R. H. (1936) — *Stain Technol.*, 9 : 167.
TU, C. C. & KIMBROUGH, J. W. (1973) — *Mycologia*, 65 : 941—944.
TUITE, J. (1969) — „Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria". Burgess Publ. Co., Minneapolis.
URBAN, Z. (1963) — *Česká Mycol.*, 17 : 193—194.
VÁGÁS, E. & MAÁCZ, G. J. (1960) — *Stain Technol.*, 35 : 220—222.
WATLING, R. (1968) — *J. Quekett microsc. Club*, 31 : 95—105.
— (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology". Vol. 4 : 567—597. Academic Press, London & New York.
WENZL, H. (1939) — *Zentbl. Bakt. ParasitKde*, Abt. 2, 100 : 327—342.
WESTON, W. H. (1929) — *Science, N. Y.*, 70 : 455.
WHITE, N. H. & BAKER, E. P. (1954) — *Phytopathology*, 44 : 657—662.
WITTMANN, W. (1970) — *Pflanzenschutzberichte*, 41 : 91—94.
WRIGHT, J. E. (1964*a*) — *Mycologia*, 56 : 692—695.
— (1964*b*) — *Mycologia*, 56 : 785—786.
ZOBERI, M. H. (1967) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 50 : 157—158.

BCU CLUJ LIBRARY

Capitolul 4

C u l t i v a r e a

Cercetarea ciupercilor necesită aproape întotdeauna cultivarea lor în condiţii de laborator. Aceasta se face pe medii de cultură sau pe diferite materiale. Unele ciuperci care nu se dezvoltă pe medii *(Erysiphaceae,* majoritatea reprezentanţilor ordinelor *Uredinales* şi *Peronosporales)* se cultivă pe plantule, sau, cel mai des, pe frunze detaşate sau fragmente de frunze, păstrate în soluţii nutritive (vezi pag. 150).

4.1. Mediile de cultură

Necesităţile nutritive ale ciupercilor sînt atît de diverse încît nu există un mediu standard pentru toate speciile. Unele medii ca : Czapek, cartof-dextroză-agar, malţ-agar etc., permit totuşi dezvoltarea unui număr mare de specii, în timp ce altele sînt specifice unui număr restrîns sau chiar unei singure specii. Mediile pot fi preparate din substanţe sintetice, chimic pure, şi aceste medii sînt folosite în cercetările privind biochimismul ciupercilor, dar cele mai multe ciuperci cresc mai bine pe medii preparate din plante sau alte surse de substanţe organice. Mediile se folosesc în stare lichidă, ciupercile dezvoltîndu-se la suprafaţă sau în profunzimea lor, sau în stare solidă, solidificarea realizîndu-se prin adăugare de agar sau silicagel. Ciupercile se mai pot cultiva şi pe diferite materiale ca : tulpini, seminţe, paie, frunze, sol, dejecţii etc.

4.1.1. Componentele mediilor de cultură

Componentele principale ale mediilor sînt substanţele minerale şi/sau organice, ca surse de elemente nutritive, apa ca solvent al acestor substanţe şi agentul de solidificare care, de obicei, este agarul.

A. **Substanţele nutritive** necesare ciupercilor sînt, după C o c h r a n e (1958), următoarele :

1) *Sursele de carbon :* monozaharide (glucoza, fructoza, manoza, galactoza, xiloza, arabinoza, ramnoza, riboza, acizi polihidroxilici, acizi zaharici), oligozaharide (maltoza, celobioza, trehaloza, sucroza, lactoza, melibioza, rafinoza), polizaharide (amidon, glicogen, inulina, celuloza, chitina, substanţe pectice), acizi organici (tartric, oxalic, malonic), lipide, aminoacizi, produse naturale (lignină, keratină, taninuri).

Monozaharidele, în special glucoza, favorizează creşterea vegetativă, luxuriantă dar, după cîteva transferări, ciupercile devin sterile. De obicei ciupercile au nevoie de mai puţină glucoză decît cantităţile menţionate în formulele mediilor (D a d e, 1960). Recent, T r i b e & M a b a d e j e

(1972) demonstrează că ciupercile crescute în absența substanțelor organice își procură carbonul din săruri minerale, apă, aer sau sticlă.

2) *Sursele de azot* anorganic (săruri de amoniu, nitriți, nitrați), proteine și peptide (gelatină, cazeină, albumină din ou, keratină, peptonă), aminoacizi și amide (glicină, glutamină, asparagină, acid glutamic, acid aspartic), amine, uree etc. Peptona, ca sursă de azot, poate lipsi din mediile pentru ciuperci (Anonim, 1968). După Cooke (1968) raportul C/N în mediile agarizate folosite la izolarea ciupercilor trebuie să fie de 9—12/1.

3) În sfîrșit pentru creșterea ciupercilor mai sînt necesare *elemente minerale* (fosfor, potasiu, sulf, magneziu, fier, zinc, cupru, mangan, molibden, calciu, cobalt etc.) și *vitamine.*

B. **Apa.** Apa de robinet este preferată deseori pentru prepararea mediilor, deoarece conține microelemente necesare creșterii ciupercilor. Totuși, uneori, cantitatea de dezinfectanți, în special cloramină, devin toxici pentru unele ciuperci ca *Phytophthora* și în aceste cazuri este necesară folosirea apei distilate în recipiente de sticlă sau chiar dublu distilată, deionizată (Anonim, 1968). Aceasta din urmă, deși deionizată, poate conține contaminanți de la rășini sau bacterii. Adăugarea de cărbune adsorbant 0,5% în apa care conține metale grele, toxice, este de obicei utilă (Tuite, 1969).

C. **Agenții de solidificare**

1) *Agarul* este un hidrat de carbon care se obține din alge marine aparținînd genurilor : *Ahnfeltia, Chondrus, Gelidium, Gigartina, Gracilaria, Phyllophora* și *Pterocaldia.* Agarul diferă din punct de vedere chimic și fizic în funcție de specia de algă folosită sau de amestecul de specii, timpul de recoltare, precum și de metoda de prelucrare pentru obținerea produsului finit (La Brijn & Kauffman, 1970; Booth, 1971a). Din această cauză, în experimente, cum ar fi cele relative la viteza de creștere, la efectul diferitelor substanțe asupra sporulării sau germinării etc., trebuie să se țină seama de acest lucru și se va specifica tipul de agar folosit.

Pentru cercetările de fiziologie sau genetică și, în general, în toate situațiile cînd experimentele necesită un grad sporit de acurateță, trebuie folosit un agar purificat. Uneori sorturile de agar special, purificat (Noble agar „Difco" sau „Oxoid" nr. 2), conțin substanțe inhibitoare (Booth, 1971a). Deoarece prețul acestor tipuri de agar este ridicat o purificare parțială se poate obține prin una din metodele următoare :

— Agar „Difco" este percolat cu cîteva volume de soluție 5% piridină (se va lucra în nișă) și apoi cu soluție 1% HCl. Se neutralizează agarul cu hidroxid de calciu și se spală pentru a elimina calciul. Se tratează cu alcool 95% și se deshidratează la temperatură joasă (Robbins & Hervey, 1962).

— Se pun 450 g agar într-un flacon de 6 litri. Se adaugă 5 l apă distilată și 500 ml piridină, și se păstrează 24 ore. Se introduce în flacon un tub de sticlă de 6 mm diametru, suficient de lung pentru a ajunge la partea inferioară a flaconului, se leagă gîtul flaconului cu o bucată de tifon, se răstoarnă și se scurge lichidul. Se spală agarul de 3 ori cu apă distilată apoi de două ori cu alcool 95% și se lasă în alcool peste noapte.

 Se pune agarul, în straturi subțiri, între pînze de tifon spălate, și se

deshidratează. Procesul durează aproximativ 10 zile (Lilly & Barnett, 1951).

— Se pune agarul într-un sac de muselină și se imersează în apă pentru 2—3 zile. Se transferă într-un vas conținînd aproximativ $^1/_2$ din volumul de lichid necesar pentru prepararea mediului, se dizolvă prin încălzire și se procedează ca la prepararea mediilor (Dowson, 1957).

Lipsa agarului în timpul războiului (1939—1945) a dus la preocupări pentru recuperarea agarului folosit (Andersen, 1943; Roy & Ray, 1944) și la utilizarea unor substituenți ca pectatul de sodiu (McCready & al., 1943) sau făina și amidonul de porumb (Wellman, 1943).

2) *Silicagelul.* Deoarece compoziția chimică a agarului, în special în vitamine și minerale, nu este cunoscută, s-a preconizat folosirea silicagelului pentru prepararea mediilor.

Duché & al. (1949) propun următoarea metodă: se prepară o soluție din 200 ml silicat de potasiu în 500 ml apă distilată și o altă soluție din 38 ml acid fosforic în 500 ml apă. Substanțele nutritive necesare preparării mediului se pun, în concentrații duble, în soluția de acid fosforic. Într-o eprubetă se pun 5 ml din soluția de acid fosforic cu substanțele nutritive și 2 picături dintr-un indicator de pH și apoi se adaugă soluție de silicat pînă la obținerea pH-ului dorit. Eprubeta se agită rapid pentru amestecarea soluțiilor și apoi se așază pe un suport înclinat, pentru formarea gelului. În următoarele eprubete nu mai este nevoie de indicatorul de pH ci se pune aceeași cantitate de silicat. La fel se procedează și pentru vasele Petri. Sterilizarea se face în autoclav, 20 minute la 120°. Pentru a obține un gel fără fisuri este necesar să se răcească autoclavul lent, timp de 3—4 ore.

Metoda lui R. Heller (Rapilly, 1968): se prepară o soluție din 200 ml silicat de sodiu tehnic și 800 ml apă și una din 500 ml acid clorhidric concentrat și 400 ml apă. Se toarnă într-un vas Petri cîte 15 ml din fiecare soluție. Se lasă un timp variabil — funcție de aciditate — pentru solidificare. Se elimină acidul clorhidric în exces punînd vasele Petri la dializat în apă distilată, care se înlocuiește de mai multe ori în decurs de 24 ore. Se verifică pH-ul și se înlătură excesul de apă. Se sterilizează gelul și capacul vasului la o lampă de UV. Se impregnează gelul cu cîte 2 ml mediu la fiecare vas Petri și se inoculează.

Alte metode de preparare a silicagelului sînt descrise de Codner (1969).

4.1.2. Prepararea mediilor

A. **Sterilizarea sticlăriei** se face în etuve. Deoarece diferențele de temperatură, la diferite nivele, în interiorul etuvelor, mai ales dacă elementele de încălzire (rezistențele electrice) sînt așezate la bază, pot ajunge la 40° (Sykes, 1969), etuvele trebuie prevăzute cu ventilatoare. După spălare cu detergenți sau cu amestec oxidant, clătire cu apă de robinet și apoi apă distilată, vasele Petri sau flacoanele se împachetează individual sau cîte două în hîrtie subțire, sau se introduc în cutii de carton sau tablă. Se așază în etuvă, lăsînd spații între ele. Vasele Petri pot fi sterilizate și fără a fi împachetate dacă sînt utilizate la timp scurt după sterilizare și dacă nu sînt transportate departe de etuvă. Timpul

necesar sterilizării, în funcție de temperatură este, după G. F. Reddish (Tuite, 1969), următorul :

Temp. (°C)	Timp (minute)
170	60
160	120
150	150
140	180
121	10—14 ore

Dacă sticlăria se împachetează în hîrtie, se vor folosi temperaturile mai scăzute, deoarece hîrtia devine casantă. Smith (1971) preferă 160° timp de trei ore.

B. **Dizolvarea ingredientelor** în apă se face pe rînd, ordinea fiind de obicei cea indicată în rețetă. Fiecare substanță se adaugă după ce precedenta a fost dizolvată. Microelementele trebuie adăugate ca soluții concentrate (Elliot & Georgala, 1969). Diferite firme („Difco" Laboratoires, Detroit ; „Oxoid" Ltd, London ; Baltimore Biological Laboratory Inc., Baltimore) produc medii gata preparate, deshidratate, sub formă de pulbere, care necesită doar înmuiere în apă rece cel puțin 15 minute și dizolvare prin încălzire înainte sau în timpul sterilizării. Deoarece agarul se dizolvă lent (1—2 ore de fierbere) este indicată dizolvarea separată, în jumătate din cantitatea de apă și amestecarea, după dizolvare, cu cealaltă jumătate care conține ingredientele. Deși multe rețete indică folosirea a 2% agar, calitatea agarului produs în momentul de față face suficientă întrebuințarea doar a 1,2% (Tuite, 1969). Agarul de bună calitate nu modifică pH-ul mediului așa că poate fi adăugat după dizolvarea celorlalte ingrediente și după ajustarea pH-ului. Agarul nu solidifică în medii foarte acide sau foarte alcaline.

C. **Distribuirea mediului** se face imediat după preparare, cînd are aproximativ 70°. Mediul se toarnă în eprubete sau flacoane McCartney, cu ajutorul unei pipete prevăzute cu pîlnie și clemă. Cantitatea nu se poate măsura exact. Folosind un dispozitiv similar biuretei se pot distribui cantități egale. Pentru evitarea umectării marginii eprubetelor în timpul turnării, se poate folosi dispozitivul de sticlă descris de Giddings (1924). În cazul cînd se prepară cantități mari, cele mai indicate sînt aparatele automate de tip „Dispensor" produse de Struers Chem. Lab. Copenhaga, care asigură distribuirea unor cantități egale. Metode pentru distribuirea mediilor în eprubete, în condiții sterile, sînt descrise de Riker & Riker (1936), Herrick (1942) și Rigler & Greathouse (1940). Pentru distribuirea în vasele Petri, metoda cea mai indicată este sterilizarea cantităților necesare (10—20 ml) în eprubete și apoi turnarea mediului în vasele Petri. Pentru evitarea condensării vaporilor de apă pe capacul vasului Petri este bine ca mediul să fie turnat cînd are temperatura de aproximativ 45°. Dacă nu se folosește imediat, mediul poate fi păstrat în eprubete și, la momentul dorit, se încălzește pe o baie de apă pentru a-l lichefia. Această metodă este superioară turnării și păstrării mediului din flacoane de 0,5—1 litru prin aceea că, pe de o parte se asigură distribuirea unor cantități egale, iar pe de altă parte pericolul contaminării este mult diminuat. Pentru distribuirea mediilor în vasele Petri în mod automat, în condiții sterile, se poate folosi aparatul „Petrimat" produs tot de firma Struers.

Eprubetele se închid cu dopuri de vată hidrofobă sau hidrofilă, dopuri din spumă de poliuretan (Claus, 1959 ; Chu, 1970) — în acest caz este recomandată utilizarea pensei pentru introducerea dopurilor (John-

son, 1971) — cu capace metalice din aluminiu (Anonim, 1948) sau oţel inoxidabil (Morton, 1957). Flacoanele McCartney se închid cu capace de aluminium şi garnituri de cauciuc, iar pentru flacoanele cu deschidere largă, Weaver & al. (1953) au propus un dispozitiv cu hîrtie de filtru care permite schimbul de gaze în timpul păstrării.

D. **Măsurarea pH-ului mediilor de cultură** este descrisă pe larg de Mesrobeanu & al. (1961), Nestorescu (1965) şi Hulea (1969). Măsurarea şi corectarea sau ajustarea se poate face înainte sau după sterilizare. Pentru corectare se folosesc soluţii molare de HCl sau NaOH şi de cele mai multe ori cantitatea este indicată în reţetă. La controlul pH-ului trebuie avut în vedere că acesta scade, la majoritatea mediilor, cu 0,2 unităţi în timpul autoclavării (Elliot & Georgala, 1969). După Zinkernagel (1967) modificările pot fi şi mai mari în funcţie de compoziţia mediului şi cantitatea sterilizată, aceasta din urmă netrebuind să depăşească 500 ml. După Child & al. (1973) folosirea soluţiilor tampon cu concentraţie mare elimină variaţiile de pH.

E. **Filtrarea şi clarificarea mediilor,** recomandată destul de des, nu are o justificare ştiinţifică. Substanţele fiind deja dizolvate, filtrarea nu face decît să îndepărteze unele fragmente care, cel mult, opacizează mediul, dar nu-i influenţează compoziţia chimică. Clarificarea are deseori un efect nefavorabil asupra ciupercilor fitopatogene şi, în general, medii foarte clare sînt rareori necesare (Anonim, 1968). Totuşi, pentru unele cercetări, cum ar fi cele privind producerea de substanţe antagoniste sau pentru urmărirea reacţiilor dintre hife, este necesară clarificarea mediilor, care se poate face, după Riker & Riker (1936) şi Booth (1971 a), în felul următor : Se răceşte mediul la aproximativ 45° şi, amestecînd cu o baghetă, se adaugă un albuş de ou, bătut. Se încălzeşte pe baie pînă cînd albuşul este coagulat complet (1/2 oră). Se decantează mediul avînd grijă să nu se fragmenteze albuşul coagulat şi se filtrează prin filtru Büchner care conţine un strat de hîrtie de filtru macerată, gros de aproximativ 5 mm. Înainte de utilizare se spală bine filtrul şi hîrtia cu apă distilată, fierbinte.

F. **Sterilizarea** se poate face fie la cald, prin încălzirea mediilor la temperaturi suficient de mari pentru ca formele de rezistenţă sau vegetative ale microorganismelor să fie omorîte, fie la rece, prin agenţi chimici. Sterilizarea la cald se face cu vapori de apă, în autoclav, sub presiune. Controlul procesului de sterilizare trebuie făcut cu termometrul şi nu cu manometrul (Sykes, 1969 ; Tuite, 1969). În funcţie de capacitatea autoclavului timpul de încălzire şi răcire este diferit. În cazul controlului cu manometrul dacă în autoclav au rămas perne de aer, şi aceasta se întîmplă aproape întotdeauna, conform legii amestecului de gaze (Dalton) presiunea rezultată este o sumă a celor două gaze (aer şi vapori de apă) şi deci sterilizarea este incompletă. Corelaţia dintre temperatură (°C) şi presiune (at) în cazul vaporilor de apă, pentru valorile cele mai folosite în sterilizarea mediilor, sînt menţionate mai jos :

°C	108	116				120	121				122	127
at	0,34	0,67	0,74	0,85	0,88	0,96	1,01	1,08	1,15	1,21	1,28	1,35
p.s.i.*	5	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

* Deoarece în literatura de limba engleză presiunea este dată în p.s.i. (pounds/square inch) au fost incluse şi valorile corespunzătoare acestei unităţi de măsură.

Dacă mediile sînt supraîncălzite unele zaharuri şi agarul pot forma compuşi toxici pentru ciuperci iar vitaminele, în cazul mediilor care conţin vegetale, sînt inactivate (Smith, 1971). Pentru hidraţii de carbon, substanţele de creştere şi antibiotice, este de preferat sterilizarea separată în autoclav, ori sterilizarea prin filtrare sau la rece (Tuite, 1969). Papavizas & Ayers (1965) remarcă faptul că glucoza sterilizată prin filtrare cu filtre Seitz inhibă creşterea lui *Aphanomyces euteiches*, dar cea sterilizată în autoclav nu. După Theil & al. (1952) sterilizarea durează 20 ore la 100°, 2½ ore la 110°, 51 minute la 115°, 15 minute la 121°, 6,4 minute la 125° şi 2,4 minute la 130°. Timpii şi temperaturile cele mai folosite sînt: 15—20 minute la 121° şi 20—30 minute la 115°. Durata sterilizării depinde şi de cantitatea de mediu. După G. F. Reddish (Tuite, 1969) timpul necesar pentru diferite volume este următorul:

Flacoane (pline ½ sau ⅔)	Sterilizarea la 121—123° (în minute)
1 l	20—25
500 ml	17—22
200 ml	12—15
125 ml	12—14
Eprubete	
18 × 150 mm	12—14
38 × 200 mm	15—20

Mediile care nu suportă temperaturile ridicate se vor steriliza prin tyndalizare, adică prin încălzire la 80°, fără presiune, timp de 30 minute, trei zile consecutiv. În unele cazuri se poate steriliza la temperatura de 100°, mărindu-se timpul la o oră (Sykes, 1969), sau la 121° timp de 12—15 minute, urmată de răcire imediată (Tuite, 1969).

Sterilizarea la rece cu oxid de propilen sau de etilen a fost preconizată de Hansen & Snyder (1947). Părţi de plante folosite pentru cultura ciupercilor (seminţe, tulpini, fructe, tuberculi etc.), pot fi sterilizate în felul următor: Se pun într-un borcan de conserve care poate fi închis ermetic, se umectează, se introduce oxidul de etilen sau de propilen în cantitate de 1 ml/l container, se închide şi se lasă 12 ore sau mai mult. Oxidul de propilen trebuie păstrat la rece la 7° şi manevrat cu grijă iar oxidul de etilen este exploziv în amestec cu aerul de aceea trebuie folosit în amestec cu CO_2 sau metan fluorinat „Freon" (Tuite, 1969). Klarman & Craig (1960) expun mediul turnat în vase Petri, acoperit cu capace, la o concentraţie de oxid de propilen de 1 ml/l container, timp de 24 ore. Thompson & Gerdemann (1962) introduc în fiecare vas Petri cu mediu nesteril cîte 1 ml oxid de propilen. Vasele Petri sînt păstrate pe masă şi pot fi inoculate după 6 ore de la sterilizare.

Iulius & Bazinov (1963) propun sterilizarea mediilor cu o soluţie de 1% β-propiolactonă. Se toarnă soluţia în flacoanele cu mediu şi se păstrează 3 ore la 37°. Allen & Soike (1966) au imaginat o metodă de sterilizare prin descărcarea unui arc voltaic sub suprafaţa mediului lichid.

4.1.3. Păstrarea mediilor

Pentru economie de timp și pentru a avea totdeauna la dispoziție medii gata pregătite este avantajoasă prepararea unor cantități mai mari de diferite medii și conservarea lor. Principala dificultate este însă deshidratarea și infestarea cu contaminanți. Ambele deficiențe se pot evita în felul următor : Eprubetele sau vasele Petri cu mediu se lasă pe mese în laborator, timp de 24 ore după turnare, pentru ca excesul de umiditate să fie eliminat. După acest interval, se pun în pungi din polietilenă, introducîndu-se și un tampon de vată îmbibată cu oxid de propilen, și se închide punga ermetic cu inele de cauciuc sau benzi metalice. Păstrarea se face în frigider la 2—4° sau la temperatura camerei (E l l i o t & G e o r g a l a, 1969). Folosind această metodă, M o r t o n (1961) a reușit să păstreze eprubete cu mediu cartof-dextroză-agar timp de 10 luni, la temperatura laboratorului, iar culturile obținute nu au fost diferite de cele făcute pe mediu proaspăt. W a t s o n & al. (1966) au păstrat mai mult de un an, în mod similar, mediu turnat în vase Petri.
La folosire, pentru obținerea unei suprafețe umede, este bine ca mediul să fie retopit și resolidificat (A n o n i m, 1953).
R a a b e & W i l h e l m (1958) păstrează mediul apă-agar, în stare lichidă, în flacoane de 200—400 ml, la temperatura de 50°, pînă la 10 zile.

4.1.4. Inocularea și transferul

Inocularea și transferul, deși par simple, sînt efectuate de multe ori greșit, ceea ce duce la contaminări nedorite ale culturilor, la infestarea laboratorului și chiar a operatorului. Manipularea culturilor de ciuperci trebuie făcută ca și cum s-ar lucra cu microrganisme patogene deoarece, așa cum remarcă D a r l o w (1969) : „Linia de despărțire între patogeni și nepatogeni nu este clar definită". Acul de însămînțat nu trebuie să fie prea lung și va fi confecționat din platină sau un aliaj care nu vibrează. Nu se va introduce fierbinte în cultură, iar după inoculare este bine să fie imersat în alcool 70% și nu trecut direct în flacăra becului de gaz deoarece, prin încălzire bruscă, fragmente de inocul sînt dispersate în aer. Suprafața de lucru trebuie să fie acoperită cu un material poros, nu cu faianță, și să fie umectată continuu cu un dezinfectant. În sfîrșit este de dorit să se lucreze sub hotă. Diferite aspecte ale măsurilor de protecție și ale condițiilor care trebuie îndeplinite în timpul lucrului sînt discutate pe larg de D a r l o w (1969).
În timpul transferării inoculului dintr-un vas în altul, o cerință esențială este ca deschiderea vaselor să se facă pentru un timp limitat iar traseul parcurs de ansă sau acul de însămînțat să fie cît mai scurt.
În cazul transferului dintr-o eprubetă în alta, ordinea operațiilor este următoarea : eprubeta care conține cultura și una sau două eprubete cu mediu proaspăt se țin, dacă operatorul nu este stîngaci, în mîna stîngă, între degetul mare și arătător, în poziție paralelă, suprafața mediului fiind orientată spre operator iar dopurile la același nivel. Se încălzește ansa la roșu, flambîndu-se și tija. Ținînd ansa în mîna dreaptă se apucă dopurile cu degetul mic și se extrag. Se flambează deschiderile eprubetelor. Se introduce ansa în tubul cu cultură, se cufundă în mediu pentru răcire și apoi, dintr-un alt punct al culturii, se desprind sporii sau un fragment de miceliu. Cu o mișcare rapidă, dar nu agitată, se trece

acul în eprubeta cu mediu proaspăt atingînd suprafaţa mediului. Se flambează deschiderile eprubetelor, se introduc dopurile, după care acul se imersează în alcool, sau se încălzeşte la roşu.

Principala dificultate la inocularea vaselor Petri este obţinerea unei singure colonii, sau mai multe, într-o poziţie dorită. De obicei sporii sau fragmentele de miceliu cad de pe acul de însămînţat pe suprafaţa mediului, în timpul transferului şi, după incubare, apar colonii numeroase, distribuite neregulat. Acest neajuns poate fi eliminat prin însămînţarea mediului din vasele Petri cu o suspensie de spori obţinută, eventual, prin amestecarea sporilor cu mediul, în eprubeta din care se transferă. O metodă mai sigură constă în răsturnarea vasului Petri, ridicarea vasului cu mediu şi inocularea, prin atingerea suprafeţei mediului cu acul, de jos în sus, avînd grijă ca, în tot timpul operaţiei, suprafaţa mediului să fie îndreptată în jos. Vasul Petri poate fi lăsat, pentru incubare, în această poziţie.

De altfel, vasele Petri trebuie păstrate, după solidificarea mediului, răsturnate. Prin acest procedeu se înlătură aproape complet pericolul contaminării.

Pentru cazurile cînd se lucrează cu flacoane cu deschidere largă, se pot folosi procedeele descrise de Johnson & Tucker (1954) şi Lambert (1957).

Transferul porţiunilor uniforme de inocul, din culturi obţinute în vase Petri, se face prin tăierea unor discuri din cultură şi trecerea lor în alte vase Petri cu mediu proaspăt. Dispozitive speciale pentru acest fel de transfer sînt descrise de Clark (1962), Leach (1965), Reid (1966) Fusaro (1972) şi Kurtzman (1973).

Garrett (1946) a descris un dispozitiv pentru inocularea vaselor Petri, simultan în mai multe puncte.

4.1.5. Incubarea

Incubarea se face în termostate prevăzute, eventual, cu surse de iluminare, umidificare şi aerisire. Pentru creştere, în afară de elementele nutritive, ciupercile trebuie să fie expuse la temperatură, umiditate, pH şi iluminare favorabile (Moore-Landecker, 1972).

Majoritatea ciupercilor se dezvoltă bine la temperaturi cuprinse între 15 şi 30° iar temperatura minimă este de 0—5°. Speciile psihrofile au un optimum în jur de 10°. Astfel, după Remsberg (1940), *Typhula variabilis* are optimum la 12—15° iar *T. idahoensis* între 9 şi 12°. Temperatura minimă pentru *Fusarium nivale* este de 2° iar *Phacidium infestans* creşte bine la 5° şi parţial chiar la —21° (Deverall, 1968). Specii de *Cladosporium* şi *Sporotrichum* pot creşte la —5° pînă la —8° (Berry & Magoon, 1934). Ciupercile termofile cresc între 20 şi 60° (Emerson, 1968). Un izolat de *Coprinus fimentarius* a manifestat un optimum la 40° (Moore-Landecker, 1972).

Concentraţia ionilor de hidrogen (pH-ul) favorabilă pentru majoritatea ciupercilor este sub 7. Ciupercile pot modifica pH-ul mediului, în timpul creşterii.

Umiditatea relativă optimă se situează între 95 şi 100%, creşterea este încetinită la 80—85%, şi numai puţine ciuperci cresc la 65%. Majoritatea ciupercilor sînt incapabile să crească în soluţii cu presiune osmotică mare, dar gradul de toleranţă diferă de la specie la specie (Moore-

Landecker, 1972). Folosirea mediilor cu presiune osmotică mare, prin adăugarea de zahăr sau NaCl, permite izolarea unor ciuperci care nu se pot izola cînd se utilizează medii obişnuite (Moreau & al., 1964).

Lumina vizibilă şi cea „aproape vizibilă" (200—750 nm) influenţează profund multe aspecte ale creşterii, dezvoltării, reproducerii şi comportamentului ciupercilor (Leach, 1971). În general, lumina este favorabilă sporulării şi în timpul creşterii trebuie asigurate condiţii de iluminare apropiate de cele din natură. Folosirea luminii din spectrul apropiat de UV („black light"), alternînd cu întunericul, este favorabilă pentru sporularea ciupercilor pigmentate (Leach, 1971).

4.1.6. Purificarea culturilor

Ciupercile trăiesc în natură în asociaţie şi în relaţii cu alte microorganisme. De aceea culturile pure reprezintă, din multe puncte de vedere, o stare anormală. Aceasta este una din explicaţiile faptului că multe specii nu cresc, sau nu formează organe de înmulţire vegetativă sau sexuată, decît dacă sînt cultivate în asociere cu alte ciuperci sau bacterii. Dade (1960) citează numeroase cazuri de acest fel iar Gindrat (1966) menţionează rolul bacteriilor pentru formarea periteciilor în culturile de *Gaeumannomyces graminis*.

Culturile pure sînt totuşi indispensabile pentru studierea morfologiei sau fiziologiei ciupercilor. Cei mai frecvenţi contaminaţi, atît la izolare cît şi în timpul transferării sau conservării, sînt bacteriile. Înlăturarea bacteriilor din culturile de ciuperci se poate face prin bariere fizice, bazate în special pe deosebirile în ceea ce priveşte tipul de creştere al bacteriilor şi ciupercilor, prin factori fizici ca temperatura sau razele UV şi prin factori chimici (schimbarea pH-ului sau folosirea antibioticelor sau a altor substanţe inhibitoare).

A. **Bariere şi factori fizici.** Raper, J. R. (1937) şi Ark & Dickey (1950) ataşează 3 sfere cu diametrul de 2—3 mm, din material plastic termorezistent, la partea inferioară a unui inel folosit la celulele van Tieghem. Se introduce inelul într-un vas Petri şi se sterilizează. Se toarnă un mediu favorabil pentru creşterea ciupercii, astfel încît 2—3 mm de la partea superioară a inelului să rămînă deasupra mediului. Pe mediul din interiorul inelului se inoculează fragmente din cultura infestată. Miceliul va străbate agarul pe sub inel şi ciuperca, liberă de bacteriile contaminate, va putea fi izolată din zona din afara inelului.

Brown (1924), Sleeth (1945), Schmitthenner & Hilty (1962) descriu diferite metode, care constau în inocularea mediului agarizat dintr-un vas Petri şi apoi răsturnarea mediului cu suprafaţa inoculată în jos. În timpul incubării ciupercile traversează mediul şi pot fi izolate la suprafaţă, în timp ce bacteriile şi antinomycetele rămîn pe suprafaţa inferioară a mediului, lipită de vasul Petri.

Machacek (1934) toarnă mediul cartof-dextroză-agar într-un vas Petri şi, înainte ca să se solidifice, pune o cantitate mică de inocul, dintr-o cultură de *Pythium* infestată cu bacterii, pe mediu şi acoperă cu o lamelă circulară, presînd astfel încît lamela să adere complet la mediu. Se incubează şi ciuperca va creşte, liberă de bacterii, la marginea lamelei de sticlă, de unde poate fi izolată.

În cazul ciupercilor filamentoase cu creștere rapidă, deseori este suficientă însămînțarea lor în partea mediană a mediului pus în eprubete. Datorită vitezei de creștere mai mari ciuperca va putea fi izolată în partea superioară a mediului (Rapilly, 1968).

Procedeul Volkonsky (Langeron & Vanbreuseghem, 1952) constă în acoperirea părții interioare a capacului vasului Petri cu un strat de mediu agarizat. Culturile contaminate se vor inocula pe mediul din vasul Petri și ciupercile filamentoase vor atinge mediul fixat pe capac, de pe care vor fi izolate.

Multe ciuperci cresc la temperaturi mai scăzute decît cele necesare bacteriilor și, în aceste condiții, acoperă și depășesc coloniile bacteriene, putînd fi izolate (Tuite, 1969; Booth, 1971a).

Iradierea mediilor cu raze UV înainte de inoculare are ca efect apariția unor factori inhibitori pentru creșterea bacteriilor (Blank & Tiffney, 1936) iar iradierea cu „black light", adică UV cu lungimea de undă de 300—380 nm, are același efect (Leach, 1971).

B. **Factorii chimici** care inhibă creșterea bacteriilor sînt folosiți cel mai des și o sinteză asupra lor este făcută de Tuite (1969 : 94—95). Adăugarea în mediul de cultură a sulfatului de cupru în concentrație de 0,05% (Ch'in, 1938) sau a teluritului de potasiu 0,01—0,1% (Ch'in, 1938; Schonborn, 1966), a sulfatului de aluminiu sau a tiocianatului de potasiu 4,86% (Bojanovsky, 1938) împiedică creșterea bacteriilor. Coloranții ca violetul de gențiană (Epstein & Snell, 1940), floxina (Cooke, 1968) și mai ales roz-bengalul în cantitate de 67 mg/l, au dat rezultate excelente (Cooke, 1968; Ottow, 1972). Mediile care conțin roz-bengal nu trebuie expuse la lumină deoarece clorul din compoziția roz-bengalului formează compuși toxici (Pady & al., 1960; Ottow, 1972).

Reducerea pH-ului mediului la 4,2, prin adăugarea de HCl sau H_2SO_4 (Waksman, 1922; Cooke, 1954), acid boric (Tyner, 1944) sau acid lactic (Hopkins, 1921; Riker & Riker, 1936) are același efect.

Folosirea antibioticelor este metoda cea mai folosită pentru eliminarea bacteriilor din culturile de ciuperci.

Penicilina în cantitate de 20—40 unități/ml mediu și streptomicina 40—100 unități/ml mediu sînt cele mai utilizate, dar trebuie adăugate după sterilizare, cînd mediul s-a răcit la 45°. Cloramfenicolul 0,05 mg/ml mediu poate fi inclus înainte de sterilizare. Prepararea soluțiilor (Buckley, 1971) : Pentru penicilină se adaugă 20 ml ser fiziologic steril la o fiolă care conține 200 000 unități. La 10 ml din această soluție se adaugă 40 ml ser, rezultînd o soluție stoc care conține 2 000 unități/ml. Se adaugă 1 ml din această soluție la 100 ml mediu și se obține o concentrație de 20 unități/ml. Pentru streptomicină se dizolvă 1 g (1 milion unități) în 20 ml ser. La 4 ml din această soluție se adaugă 46 ml ser, obținîndu-se o soluție stoc de 4 000 unități/ml. Prin adăugarea a 1 ml din această soluție la 100 ml mediu se obține o concentrație de 40 unități/ml. Cloramfenicolul : 50 mg se dizolvă în 10 ml alcool 95% și se adaugă la un litru de mediu, înainte de sterilizarea finală.

După Andleigh (1960) acromicetina 500 μg/ml mediu este mai eficace decît penicilina și streptomicina în eliminarea bacteriilor Gram negative, iar gentamicina, în concentrație de 0,05 g/l mediu, adăugată înainte de sterilizare, este superioară streptomicinei și roz bengalului, în cazul izolării ciupercilor din sol (Mukerji & Rao, 1968). Unele micostatice

ca nistatina, pimaricina, vancomicina și polimixina, deși inhibitoare pentru multe ciuperci, au fost folosite cu succes în prepararea unor medii utilizate la izolarea speciilor de *Phytophthora* și *Pythium* din sol (Eckert & Tsao, 1962; Hollomon, 1965).

Benedek (1962) propune o metodă de purificare, în care antibioticele nu se mai adaugă la mediul de cultură, ci un fragment de miceliu se imersează pentru 24—48 ore într-o soluție de antibiotice, după care se transferă pe mediu.

Medii folosite pentru izolarea ciupercilor prin eliminarea bacteriilor, sau pentru purificarea culturilor, sînt descrise, în volumul de față, la nr. 1; 20; 30 E, F, G, H; 52, 53, 60 A; 64; 100; 108; 122; 127; 129; 132; 139; 144; 150; 159 E; 163 A; 165 B; 181 C, F; 197 E, F și 202.

Pentru a verifica eficiența purificării este indicată inocularea ciupercilor, după purificare, pe medii favorabile pentru dezvoltarea bacteriilor (Tuite, 1969).

4.1.7. Formule și rețete pentru prepararea mediilor

Pentru cultivarea ciupercilor s-au descris cîteva sute de medii. Cele mai recente sinteze, folosite pe larg în volumul de față, au fost făcute de Tuite (1969) și Booth (1971a). Tsao (1970) sintetizează datele asupra mediilor selective, utilizate pentru izolarea ciupercilor patogene.

Cele 204 medii descrise în paginile următoare sînt ordonate alfabetic după denumirea componentului principal, după autorul care l-a descris prima oară sau după specia sau grupul de ciuperci pentru care este recomandat. Unele denumiri străine sau abrevieri consacrate în literatura de specialitate au fost menționate în text, atît în paginile unde este descris mediul cît și în indexul de subiecte.

1. **Alcool-agar** (Nadakavukaren & Horner, 1959)

Agar	7,5 g
Streptomicină (nitrat)	0,1 g
Apă	1 000 ml

Se pun cîte 90 ml soluție în flacoane de 200 ml și se sterilizează. Dacă se folosește sulfat de streptomicină se va steriliza 15 minute la 117°. După sterilizare flacoanele se răcesc la 45—50° și apoi se mențin la 42—44° pe o baie de apă. Înainte de amestecarea diluției de sol cu mediul, se adaugă la fiecare flacon 0,5 ml alcool absolut. Incubația se face în întuneric timp de 10—15 zile. Este indicat pentru detectarea și izolarea lui *Verticillium* din sol, mai ales de pe rădăcini. După Davies (1969) adăugarea de roz bengal și sulfat de streptomicină favorizează izolarea speciilor de *Chaetomium* din sol, cu rezultate mai bune decît mediile Czapek-Dox sau peptonă-dextroză-agar.

2. **Alphacel** (Sloan & al., 1961)

	A	B	C
Alphacel *	20 g	20 g	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g	1 g	1 g
KH_2PO_4	1,5 g	1,5 g	1 g
$NaNO_3$	1 g	1 g	1 g
Pastă de tomate „Hunt"	—	10 g	10 g
Făină de ovăz „Beech Nut Baby"	50 ml	50 ml	10 g
Lapte de cocos **	50 ml	50 ml	—
Agar	12 g	12 g	18 g
Apă distilată	1000 ml	1000 ml	1000 ml

* Celuloză nenutritivă, produsă de Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio.
** Laptele de cocos se filtrează prin cîteva straturi de muselină sau tifon și se sterilizează 15 minute la 121°. Se păstrează la 6° pînă la folosire.

Se ajustează *p*H-ul la 5,6 și se sterilizează 15 minute la 127° pentru formula A și B, și 20 minute la 131° pentru formula C. Mediu foarte favorabil pentru sporularea ciupercilor. Formula C este o modificare propusă de Weitzman & Silva-Hunter (1967) în scopul eliminării solului și părului din mediile pentru cultivarea dermatofiților, în vederea obținerii de medii standardizate și ușor de mînuit.

3. **Amidon-agar** (Booth, 1971 a)

Amidon solubil	40 g
Extract drojdii	5 g
Agar	20 g
Apă	1000 ml

Toate ingredientele se pun în apă și se încălzesc pe baie pînă se dizolvă. Se distribuie în eprubete și se sterilizează. Nu este necesară ajustarea pH-ului care, după sterilizare, are valoarea 6,5—7.

4. **Apă de mare, I**

	A	B	C	D	E
Peptonă	0,1 g	—	1 g	—	1 g
Extract drojdii	—	0,1 g	2 g	—	0,5 g
Extract ficat	—	—	—	0,01 g	0,5 g
Glucoză	1 g	1 g	—	1 g	5 g
K_2HPO_4	0,05 g	—	—	—	—
$Fe_3(PO_4)_2$	—	—	0,01 g	—	—
Citrat feric	0,01 g	—	—	—	—
Hidrolizat de gelatină	—	—	—	1 g	1 g
Apă de mare	1000 ml	1000 ml	750 ml	1000 ml	1000 ml
Apă distilată	—	—	250 ml	—	—
Agar	18 g	18 g	5 g	12 g	12 g

Pentru mediile A, B, C, se folosește apă de mare învechită în felul următor : se filtrează apa proaspătă prin filtru de sticlă de porozitate medie sau prin tampon de vată și apoi se păstrează, la întuneric, într-un flacon închis cu dop de vată, timp de 3—6 săptămîni.

A — Folosit pentru izolarea ciupercilor neperfecte lignicole și a unor *Ascomycete* caulicole (Johnson & Sparrow, 1961).

B — Folosit la izolarea ciupercilor marine, saprofite. Un gram de fitonă poate înlocui extractul de drojdii. Se sterilizează 15 minute la 121° (Johnson & Sparrow, 1961).

C — Propus de Oppenheimer & Zobell (1952) pentru cultivarea unor specii de *Thrauostochytriaceae ;* este modificat de Ulken (1965) și menționat de Gaertner (1970). Se folosește apă distilată în recipiente de sticlă.

D — După sterilizare se adaugă 0,5 g sulfat de streptomicină și 0,5 g penicilină G (Fuller & Poyton, 1964).

E — Pentru cultivarea *Thraustochytriaceelor* (Booth & Miller, 1968).

5. **Apă de mare, II** (Vischniac, 1956)

Apă de mare	80—100 ml	Hidrolizat de gelatină	0,1 g
Glucoză	0,1 g	Extract de ficat	0,001 g
Aneurină	0,2 mg	Acid nicotinic	0,1 mg
Pantotenat de Ca	0,1 mg	Piridoxină HCl	0,04 mg
Piridoxamină — 2HCl	0,02 mg	Acid p-aminobenzoic	0,01 mg
Biotină	0,5 µg	Vitamina B_{12}	0,5 µg
Acid folic	2,5 µg	Agar	1,5 g

Se toarnă plăcile, se lasă să se evapore apa de condensare și se inundă cu 2 000 unități de penicilină G și 0,5 mg sulfat de streptomicină. Folosit pentru izolarea *„Phycomycetelor"* marine.

6. **Apă de mare, III** (Gray & al., 1963)

Dextroză	20 g
KH_2PO_4	5 g
* NH_4NO_3	0,6 g
Extract de porumb	2 ml
Sol. microelemente	1 ml
$FeCl_3$ (sol. 1,92 g/l)	1 ml
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (sol. 44 g/l)	1 ml
Sol. vitamine	1 ml

* NH_4NO_3 se poate înlocui cu 1 g NH_4Cl.

Soluție microelemente :

H_3BO_3	0,114 g
$(NH_4)_6Mo_7 \cdot O_{24} \cdot 4H_2O$	0,484 g
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	0,780 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,144 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	16,720 g
Apă distilată pînă la	1000 ml

Soluție de vitamine :

Acid p-aminobenzoic	50,3 mg
Aneurină HCl	99,6 mg
Riboflavină	50 mg
Niacinamidă	200 mg
Inositol	400 mg
Pantotenat de Ca	200 mg
Piridoxină	50,2 mg
Apă distilată pînă la	1000 ml

Se păstrează în frigider pînă la folosire.

pH-ul se ajustează la 6 cu NaOH 0,1 N și se adaugă apă de mare pînă la un litru. Folosit pentru creșterea și sinteza de proteine la 23 genuri de ciuperci, fiind, în majoritatea cazurilor, superior mediului cu apă distilată.

7. **Apă de mare artificială** (Johnson & Sparrow, 1961)

Glucoză	5 g
NaCl	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
K_3PO_4	1 g
NH_4NO_3	0,2 g
$K_3C_6H_2O_7 \cdot H_2O$	0,5 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1 g
KCl	0,6 g
$NaHCO_3$	0,2 g
KBr	0,1 g
NaF	0,03 g
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0,04 g
Sol. microelemente	1 ml
Agar	18 g
Apă distilată	1000 ml

Soluție microelemente :	mg/l *
EDTA	0,5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,1
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05
H_3BO_3	0,02

* Concentrații finale în ioni.

8. **Apă de robinet-agar**

Agar	15—25 g
Apă de robinet	1 000 ml

Se dizolvă agarul în apă timp de 30 minute și apoi se sterilizează 20 minute la 121°. Se pot adăuga paie de grîu sau boabe de orez sterilizate. Multe ciuperci sensibile sporulează bine pe acest mediu (Anonim, 1968). Deoarece hifele cresc la suprafață și în toate direcțiile este indicat pentru izolarea vîrfurilor de creștere, în special la *Pythium* (Altman,

1966). Booth (1971 b) îl recomandă pentru izolarea din sol și stimularea sporulării la speciile de *Fusarium* iar Takashio & Vanbreuseghem (1966) menționează că transferul pe acest mediu a culturilor pleomorfe ale dermatofiților induce sporularea și chiar revenirea la tipul „wild" a speciilor crescute în prealabil pe mediul Sabouraud.

9. **Aphanomyces euteiches** (Haglund & King, 1962)

D-glucoză	5 g
L-asparagină	0,75 g
KH_2PO_4	2 g
$MgCl_2$	0,05 g
$MnCl_2$	0,005 g
$ZnCl_2$	0,005 g
$FeCl_3$	0,005 g
Apă distilată	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 5,5. Pentru creșterea ciupercii este necesară adăugarea de L-metionină sau L-cistină 5—20 ppm. Mediu indicat pentru studierea nutriției. Vezi și Papavizas & Davey (1960), Mitchell & Yang (1966) și Yang & Schoulties (1972).

10. **Armstrong** (Armstrong & Armstrong, 1960)

Sucroză sau glucoză	20 g	$Ca(NO_3)_2$	5,9 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 g	$FeCl_3$	0,2 ppm
KCl	1,6 g	$MnSO_4$	0,2 ppm
KH_2PO_4	1,1 g	$ZnSO_4$	0,2 ppm

Recomandat pentru stimularea sporulării la *Fusarium.*

11. **Asthana & Hawker** (1939)

Glucoză	5 g	$MgSO_4$	0,75 g
KHO_3	3,5 g	Agar	15 g
KH_2PO_4	1,75 g	Apă distilată	1 000 ml

Indicat pentru studiul formării periteciilor la *Sordaria destruens.*

12. **Badcock** (1941)

	A	B	C
Făină de porumb	50 g	0,6 g	10 g
Făină de oase (cu conținut de circa 3,75% azot organic)	30 g	0,4 g	—
Amidon din cartofi	17 g	—	—
Sucroză	2 g	—	—
Cenușă din lemn de pin	1 g	—	—
Rumeguș de fag sau de molid	2 000 g	20 g	100 g
Apă		40—60 ml	

Medii indicate pentru cultivarea *Basidiomycetelor.*

A — Se umezește amestecul pînă la obținerea unei greutăți de 170% față de cea uscată. Se distribuie în vase Petri și se sterilizează 20 minute la 121°. Amestecul, fără rumeguș, poate fi adăugat în cantitate de 20% la sol de grădină sau se poate folosi vată umectată peste care se presară amestecul.

B — Cantitățile sînt calculate pentru un flacon. Ciupercile care atacă esențele tari se cresc pe rumeguș de fag iar cele care atacă esențele moi pe lemn de molid. De fapt se poate folosi ori ce fel de rumeguș de lemn care putrezește ușor.

C — Formulă recomandată de Booth (1971 a). Se amestecă și se umezește bine.

13. **Barnes-agar** (Gwynne-Vaughan & Barnes, 1927)

K_3PO_4	1 g	Glucoză	1 g
NH_4NO_3	1 g	Agar	25 g
KNO_3	1 g	Apă distilată	1 000 ml

Se topește agarul în 500 ml apă pe o baie și apoi se adaugă celelalte componente dizolvate în 500 ml apă. Se sterilizează 15 minute la 121°

14. **Barnett** (1952, 1953)

	A	B
Maltoză	5 g	—
Glucoză	—	3 g
Acizi casaminici „Difco"	1 g	—
Fenilalanină	—	0,5 g
KH_2PO_4	1 g	1 g
$MgSO_4$	—	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	—
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 mg	0,2 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 mg	0,2 mg
$MgSO_4 \cdot 5H_2O$	0,1 mg	0,2 mg
Biotină *	5 μg	5 μg
Agar	20 g	20 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

* Pentru unele izolate poate fi înlocuită cu 0,5 g extract drojdii.

Se ajustează pH-ul la 6 și se sterilizează 15 minute la 121°. Recomandate pentru izolare, identificare *(A)* și producere de peritecii *(B)* la *Ceratocystis fagacearum.*

15. **Bere (must)-agar**

A — Must de bere 1 000 ml, agar 30 g.
Se topește agarul în must prin fierbere pe baie de apă timp de 15 minute. Se ajustează pH-ul la 5—5,5 și se sterilizează 10 minute la 116° (Booth, 1971 a).
B — Se alege un must de bere blondă, fără hamei, se sterilizează 15 minute la 115—120°, se filtrează fierbinte, se distribuie în eprubete sau flacoane și se sterilizează 15 minute la 120°. Densitatea la 4,8—5,6° trebuie să fie 12—14° Balling (Biourge, 1923; Langeron & Vanbreuseghem, 1952).
C — Bere (must)-gelatină-agar. Se dizolvă 1,5% agar în must în autoclav la 120° timp de 1/2 oră, apoi se adaugă o cantitate egală de must care conține 10% gelatină și se sterilizează amestecul la 110° timp de 15—20 minute (Biourge, 1923; Langeron & Vanbreuseghem, 1952).
După Smith (1971) acest mediu este mai bogat în substanțe nutritive decît mediul cu extract de malț, dar Dade (1960) consideră că nu are aproape nici un avantaj față de acesta din urmă.

16. **Bhargava** (Reischer, 1951)

KH_2PO_4	0,5 g	NH_4NO_3	2 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,5 g	Glucoză	5 g
Na_2S	0,17 g	Apă	1 000 ml

Recomandat pentru creşterea *Saprolegniaceelor*. După preparare pH-ul va fi 7.

17. **Bilai** (Joffe, 1963)

KH_2PO_4	1 g	Amidon pudră	0,2 g
KNO_3	1 g	Glucoză	0,2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Sucroză	0,2 g
KCl	0,5 g	Apă	1 000 ml

Induce formarea conidiilor la *Fusarium*.

18. **Bilă de bou-agar** (Fischer & Kane, 1968)

Bilă de bou „Difco"	20 g
Agar	18 g
Apă distilată	1 000 ml

Se dizolvă bila în apă, se adaugă agarul şi se încălzeşte pînă la dizolvare. Se sterilizează 15 minute la 121°.

Recomandat pentru identificarea rapidă a lui *Candida albicans*. După însămînţare, inoculul trebuie acoperit cu o lamelă de sticlă şi se incubează la 28°, 24—48 ore.

19. **Bonner-Addicott** (1937)

KNO_3	0,008 M	Glucoză	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,00015 M	Tartrat feric	1 mg
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0,001 M	Agar	25 g
KH_2PO_4	0,00008 M	Apă distilată	1 000 ml
KCl	0,0087 M		

Recomandat pentru inducerea sporulării la *Phymatotrichum omnivorum*. După Woods & al. (1967) pH-ul 4,6 şi iluminarea 16 ore cu lumină albastră sau albă, favorizează producerea conidiilor.

20. **Botran** (Bell & Crawford, 1967)

K_2HPO_4	0,5 g	Roz bengal	25 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Streptomicină (sulfat)	50 mg
Peptonă	0,5 g	*Botran	10 ppm
Extract drojdii	0,5 g	Apă distilată	1 000 ml
Sucroză	20 g		

* Fungicid care conţine 2,6 diclor-4 nitroanilină, produs de „Upjohn Co".

Se ajustează pH-ul la 5,5 cu soluţie normală de HCl sau NaOH, înainte de sterilizare. Streptomicina se adaugă după sterilizare. Este recomandat pentru izolarea lui *Aspergillus flavus* din sol şi alune de pămînt.

21. **Botrytis** (Netzer & Dishon, 1967)

KCl	1 g	Extract drojdii	3 g
KH_2PO_4	1,5 g	Glicerină	5 g
$NaNO_3$	3 g	L-Sorboză	2,5 g
$MgSO_4$	0,5 g	Agar	20 g
Hidrolizat de cazeină	5 g	Apă de robinet	1 000 ml

Mediu selectiv pentru diferenţierea lui *Botrytis allii* faţă de *B. cinerea* parazite pe ceapă. Sorboza reduce creşterea lui *B. allii*.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

22. **Brown-agar** (Brown, 1926)

Glucoză	2 g	$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	0,75 g
Asparagină	2 g	Agar	20 g
K_2HPO_4	1,25 g	Apă distilată	1000 ml

Recomandat pentru cultivarea lui *Sclerotium rolfsii.*

23. **Cantino (PYG)-agar** (Hornstein & Cantino, 1961)

Peptonă	1,25 g	Agar	20 g
Extract drojdii	1,25 g	Apă distilată	1000 ml
Glucoză	3 g		

Dacă se folosește ca mediu lichid este necesară adăugarea unui indicator (purpură de bromcrezol) ca să se poată ajusta pH-ul la 6,8 cu NaOH. Recomandat pentru cultivarea speciilor de *Blastocladiella.*

24. **Cărbune de lemn-apă** (Wills, 1954)

Cărbune din lemn 20 g, apă de robinet 1 000 ml.

Pentru inducerea sporulării la *Phytophtora parasitica,* după creștere pe cartof-dextroză-agar.

25. **Carlile** (1971)

Glucoză	10 g	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	0,06 g
Peptonă bacteriologică		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,034 g
„Oxoid"	10 g	Clorhidrat de aneurină	0,0424 g
Acid citric$\cdot H_2O$	3,45 g	Biotină	0,005 g
KH_2PO_4	2 g	Hemină	
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,9 g	„Sigma Equine Hemin"	0,005 g
$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	0,6 g	Apă distilată	1000 ml
$Na_2 \cdot EDTA$	0,224 g		

Se dizolvă componenții, mai puțin hemina, în apă distilată. Se ajustează pH-ul la 4,6 cu soluție 10% NaOH și se sterilizează. Se prepară o soluție de hematină prin dizolvarea heminei în 1% NaOH pentru a avea în final o soluție de 0,05% (de ex. 50 mg hemină în 100 ml soluție 1% NaOH). Soluția sterilizată de hematină poate fi păstrată la 5° timp de o săptămînă și se adaugă aseptic la mediul steril (1 ml soluție la 100 ml mediu), la temperatura camerei, chiar înaintea inoculării mediului. Pentru sterilizarea hematinei și altor componente (hematina este termostabilă în condiții de alcalinitate) este indicată autoclavarea 20 minute la 116°. Recomandat pentru cultivarea lui *Physarum polycephalum.*

26. **Carne (extract)-agar** (Booth, 1971 a)

Extract din carne		NaCl	5 g
de vacă	5 g	Agar	20 g
Peptonă	10 g	Apă	1000 ml

Se dizolvă extractul în 300 ml apă. Se amestecă peptona și NaCl cu 200 ml apă încălzită la 60°, apoi se amestecă cele două lichide și se fierb timp de 45 minute. Se adaugă restul de apă și agarul, și se dizolvă. Se ajustează pH-ul la 8 și se sterilizează 20 minute la 116°.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI BIBLIOTECA

27. **Carne de vacă-agar** (Swartz, 1934)

Carne fiartă	210 g
Agar	15 g
Apă distilată	1000 ml

Se fierbe carnea pînă se înmoaie, se strecoară prin cîteva pînze de muselină, se completează la volumul inițial, se adaugă agarul și se dizolvă. Se sterilizează 15 minute la 121°. Recomandat pentru *Pilobolus.*

28. **Carpofori** (Langeron & Vanbreuseghem, 1952)

Bucăți de carpofori, în special de *Psalliota bispora,* se introduc într-o eprubetă, pe un pat de vată înmuiată și se sterilizează 20 minute la 120°. Recomandat în special pentru creșterea dermatofiților.

29. **Cartof-agar**

	A	B	C	D	E
Cartofi	200 g	250 g	250 g	500 g	20 g
Dextroză	8 g	20 g	—	10 g	—
NaCl	—	—	—	1 g	—
Extract drojdii	0,1—1 g	1 g	—	—	—
Cărbune activ	0,5 g	—	—	—	—
Agar	20 g	20 g	25 g	—	20 g
Apă	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

A — Denumit și „freezing-agar". Se ajustează pH-ul la 7. Se pun cartofii tăiați în cuburi în 500 ml apă de robinet și se sterilizează 15 minute la 121°. Se sfărîmă cartofii, se filtrează prin 4 straturi de tifon, se aduce volumul la un litru cu apă distilată și se adaugă dextroza, extractul de drojdii și cărbunele activ (Kuehn & al., 1961; Kuhlman & Hendrix, 1962).

B — Este o modificare a mediului descris de Flentje (1956), propusă de Whitney & Parmeter (1963). Se macerează cartofii timp de o oră la 60°. Se sterilizează 15 minute la 121°.

C — Se fierb cartofii tăiați mărunt, în apă, timp de 30 minute. Se lasă să se răcească și să se depună. Se decantează lichidul și se completează la un litru. Se adaugă agarul, se încălzește pe baie de apă pînă la dizolvare și se sterilizează 15 minute la 121°. Galleymore (1949) a obținut pe acest mediu fructificații de *Lentinus tuber-regium.*

D — Se folosesc cartofi curățați de coajă. McCallan & al. (1939) a obținut sporularea abundentă la 5 specii diferite.

E — Se prepară ca mediul cartof-morcov-agar (Langeron & Vanbreuseghem, 1952).

30. **Cartof-dextroză-agar (PDA)**

	A	B	C	D	E	F	G	H
Cartofi	200 g	200 g	22 g	40 g	200 g	200 g	200 g	200 g
Dextroză	20 g	20 g	10—20 g	5 g	20 g	20 g	5 g	20 g
$CaCO_3$	—	0,2 g	—	—	—	—	—	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,2 g	—	—	—	—	—	—
Actidionă	—	—	—	—	200 ppm	—	—	—
Streptomicină	—	—	—	—	10 ppm	100 µg/ml	—	35 ppm
Aureomicină	—	—	—	—	—	—	30 ppm	35 ppm
Vancomicină	—	—	—	—	—	50 µg/ml	—	—
Tergitol	—	—	—	—	—	—	200 ppm	100 ppm
Agar	20 g	20 g	15—17 g	17 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Apă	cîte 1 000 ml la toate formulele							

Mediul cartof-dextroză agar este cel mai utilizat în micologie, fiind foarte favorabil pentru creşterea majorităţii ciupercilor, datorită efectului combinat al tuturor componentelor (Beever & Bollard, 1970).

A — Formula standard în care, uneori, se folosesc numai 10 sau 15 g dextroză şi 12 sau 15 g agar. Dextroza poate fi înlocuită cu cereloză, iar în locul cartofului s-a folosit cu succes *Dioscorea* (Maduewesi & Nwauzo, 1966) sau *Manihot* (Weststeijn & Okafor, 1971). Se va evita utilizarea cartofilor noi. Preparare : se spală şi se curăţă cartofii prin frecare (nu se decojesc) şi apoi se taie în cuburi de circa 12 mm. Se cîntăresc 200 g, se clătesc repede în apă şi se fierb, într-un vas de de sticlă sau smălţuit, timp de o oră, pînă se înmoaie. Se sfărîmă şi se strecoară cît mai multă pulpă printr-o sită fină sau tifon. Se adaugă agarul şi se fierbe pînă se dizolvă. Se ia de pe foc, se adaugă dextroza şi se amestecă pînă se dizolvă. Se completează la un litru cu apă distilată. În timpul turnării în eprubete se va agita soluţia pentru a repartiza în fiecare eprubetă o parte din substanţa solidă. Se sterilizează 20 minute la 121°.

Acidifiat prin adăugarea a 3—5 picături de acid lactic 25% la 1 000 ml mediu topit, poate fi folosit la izolarea ciupercilor de pe diferite părţi ale plantelor (Tuite, 1969). Adăugarea de „Benomil" (8 ppm), „Dicloran" (8 ppm) sau fenol (50 ppm) stimulează sporularea lui *Fomes annosus* şi a altor *Basidiomycetes* care produc putregaiul lemnului, prin inhibarea ciupercilor contaminate ca *Trichoderma* (Hunt & Cobb, 1971).

B — Formulă completată şi recomandată de Anonim (1968).

C — Propus de Lacy & Bridgman (1962). Se folosesc cartofi deshidrataţi care se pun la înmuiat în 178 ml apă distilată. Nouă specii de ciuperci au crescut tot aşa de bine ca şi pe mediul standard, gata preparat. W. L. Gordon (Both, 1971 a) a folosit acest mediu pentru *Fusarium*, obţinînd rezultate similare, dar mai constante decît pe mediul preparat cu cartofi din diferite loturi, care variază în cursul anului.

D — Recomandat de Boone & Keitt (1956) pentru producerea de conidii la *Venturia inaequalis*. Prin adăugarea de frunze de măr se obţin şi peritecii.

E — Folosit de Schneider (1956) pentru izolarea lui *Ceratocystis ulmi*. Actidona şi streptomicina se adaugă înainte de sterilizare.

F — După Latham & Linn (1961) este util pentru izolare şi mai puţin inhibitor decît mediul Martin.

G — Recomandat de Tuite (1969) pentru izolarea ciupercilor de pe seminţe. Nu inhibă toate speciile de *Rhizopus* dar adăugarea de „Botran", 8 ppm, pare să corecteze aceasta. Tergitolul şi aureomicina se adaugă înainte de sterilizare.

H — Recomandat de Steiner & Watson (1965) şi Hornby & Ullstrup (1967) pentru izolarea ciupercilor din sol.

31. Cartof-malţ-agar-celuloză (Ames, 1961)

Cartofi	60 g	Bacto-agar „Difco"	30 g
Sirop de malţ „Fleischman"	10 g	Apă distilată	2000 ml

Cartofii tăiaţi se fierb în 200 ml apă distilată pînă se înmoaie. La lichidul decantat se adaugă celelalte ingrediente. Se sterilizează 20—30 mi-

nute la 120°. Bucăți de hîrtie sugativă albă, sterilizată, se pun pe suprafața mediului rece în vasele Petri, sau pot fi puse în eprubete chiar înainte de sterilizare. Recomandat pentru inducerea formării de peritecii la *Chaetomiaceae.*

32. **Cartof-morcov-agar** (Langeron & Vanbreuseghem, 1952)

Cartofi	20 g	Agar	20 g
Morcovi	20 g	Apă de robinet	1000 ml

Se fierb cartofii și morcovii (spălați, curățați și rași în prealabil) timp de o oră în apă. Se strecoară prin sită fină fără a presa și se adaugă agarul. Se fierbe pe baie de apă pînă se dizolvă agarul. Se sterilizează 20 minute la 121°. Nu se folosesc cartofi noi. Rețeta originală prevede macerarea o oră a cartofilor și morcovilor rași, urmată de fierbere timp de 5 minute, filtrare prin vată și sterilizare 15 minute la 120°.
Este un mediu sărac, foarte indicat pentru conservarea ciupercilor și deseori favorizează sporularea. O bucată de hîrtie de filtru sterilă, așezată pe suprafața mediului, constituie un suport foarte bun pentru ciupercile celulozolitice ca *Chaetomium* (Dade, 1960; Anonim, 1968).

33. **Cartof-sucroză-agar** (Anonim, 1968)

Extract din cartofi	500 ml	Agar	20 g
Sucroză	20 g	Apă distilată	1 000 ml

Extractul de cartofi se prepară din 1 800 g cartofi, curățați de coajă și tăiați în bucăți, care se suspendă într-o pînză de muselină și se fierb în 4 500 ml apă timp de 10 minute. Se înlătură cartofii și se sterilizează lichidul, în vase de sticlă, 20 minute la 121°. Se păstrează în frigider. Pentru prepararea mediului se amestecă extractul, apa, sucroza și agarul, se încălzește încet pînă la topirea agarului se ajustează pH-ul la 6,5 cu $CaCO_3$ și se sterilizează 20 minute la 121°. Este recomandat pentru *Fusarium* (Booth, 1971 b).

34. **Ceapă-asparagină-agar** (Mundkur, 1934)

	A	B		A	B
Ceapă	100 g	200 g	Agar	15 g	20 g
Asparagină	0,25 g	—	Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml
Peptonă	0,5 g	—			

Se curăță, se taie și se fierbe ceapa în 500 ml apă. Se strecoară și se adaugă agarul și celelalte ingrediente, dizolvate în 500 ml apă. Se steriiizează 15 minute la 116° sau, după Rapilly (1968), 30 minute la 104°.
B – Formulă recomandată de Riker & Riker (1936).

35. **Celuloză** (Rautella & Cowling, 1966)

Celuloză	5 g	Extract drojdii	0,5 g
$NH_4H_2PO_4$	2 g	Adenină	4 mg
KH_2PO_4	0,6 g	Adenozină	8 mg
K_2HPO_4	0,4 g	Agar	17 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,89 g	Apă distilată	1 000 ml
Clorhidrat de aneurină	100 μg		

Folosit pentru măsurarea activității celulozolitice. Celuloza se prepară după W a l s e t h (1952): celuloză Whatman pudră se pune în acid ortofosforic 85% timp de 2 ore la 4°, se spală la rece prin suspendare și decantare repetată cu apă distilată și 1% Na_2CO_3 pînă se neutralizează. Se distribuie în eprubete de 18 mm diametru, în cantități care să asigure o coloană de 3—6 cm înălțime și se sterilizează. Se inoculează cu discuri de culturi crescute pe agar și se măsoară adîncimea zonei clarificate, la fiecare 7 zile, timp de 35 zile, la 26°.

36. Celuloză-asparagină-agar (E g g i n s & P u g h, 1962)

$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g	$CaCl_2$	0,1 g
L-asparagină	0,5 g	Extract drojdii „Difco“	0,5 g
KH_2PO_4	1 g	Agar	20 g
KCl	0,5 g	Celuloză (măcinată la moară cu bile)	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g	Apă pînă la	1 000 ml

Celuloza se prepară ca suspensie 4% în apă, din pudră de celuloză pentru cromatografie (provenită din bumbac), măcinată la moară cu bile timp de 72 ore. Suspensia de celuloză se adaugă la celelalte ingrediente ale mediului, după ce acestea au fost încălzite pe baie și înainte de sterilizare 20 minute la 116°. pH-ul final este 6,2. Folosit pentru testarea activității celulozolitice și izolarea ciupercilor celulozolitice din sol.

După P a r k (1973) omiterea asparaginei poate fi o modificare utilă deoarece se obțin rezultate mai bune atît la izolare cît și la numărarea coloniilor.

37. Celuloză-Czapek-agar (B o s e, 1963)

Celuloză	10 g
Soluția Czapek	1 000 ml
Agar	15 g

Prepararea celulozei: se pun 3 g hîrtie de filtru Whatman nr. 1, fragmentată, în 100 ml acid clorhidric concentrat și se lasă timp de 3 ore la 25—27°, agitînd din cînd în cînd. Amestecul se toarnă apoi în apă distilată, în exces. După 2—3 ore se elimină supernatantul și reziduul se spală în pîlnie Büchner pentru a înlătura acidul. La sfîrșit se spală cu alcool 95% și se usucă la aer. Prepararea mediului: celuloza se pune într-un mojar, se adaugă cîțiva ml de soluție Czapek și se mojarează pînă se transformă într-o pastă fină. Se adaugă apoi restul de soluție și agarul. Se sterilizează 15 minute la 121°. Este folosit la izolarea ciupercilor celulozolitice de pe materiale celulozice sau din sol. Un mediu similar a fost folosit de C h a c e & U r l a u b (1942) pentru stimularea sporulării *Chaetomium globosum* (vezi pag. 106).

38. Celuloză-extract drojdii-agar (B o o t h, 1971 a)

Hîrtie de filtru	12 g	Agar	10 g
Extract drojdii „Difco“	4 g	Apă robinet	1 000 ml

Se desface hîrtia în bucăți mici și se macerează în puțină apă pînă se separă fibrele. Se amestecă cu restul de apă, se adaugă extractul de drojdii și agarul. Se sterilizează 20 minute la 127°.

39. Carboximetilceluloză-agar (CMC)

	A	B	C
Tartrat de amoniu	2 g	—	—
$NaNO_3$	—	3 g	—
NH_4NO_3	—	—	1 g
KH_2PO_4	1 g	1 g	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	0,5 g	0,5 g
KCl	0,5 g	0,5 g	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g	0,01 g	—
Carboximetilceluloză	10 g	10 g	15 g
Extract drojdii	—	0,5 g	1 g
$CuSO_4$	—	10 mg	—
$MnSO_4$	—	5 mg	—
$ZnSO_4$	—	1 mg	—
$CaCl_2$	—	50 mg	—
Agar	15 g	15 g	—
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Propus de Jefferys & al. (1953).

B — Recomandat pentru izolarea ciupercilor celulozolitice din sol (Gams, 1960).

C — Carboximetilceluloza se dizolvă în apă caldă prin agitare, într-un mixer. Folosit în culturi agitate, pentru a induce formarea conidiilor la *Fusarium graminearum*, după incubație de 4 zile la 24° (Cappellini & Peterson, 1965).

40. Cereloză-azotat de amoniu (Scheffer & Walker, 1953)

Cereloză	50 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,5 g
NH_4NO_3	10 g	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,02 g
KH_2PO_4	5 g	Apă	1 000 ml

Mediu lichid pentru creșterea lui *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* în culturi neagitate.

41. Chytridiales (Miller, 1967)

	A	B
Mediu făină de porumb agar (Corn meal agar „Difco")	17 g	—
Amidon solubil	5 g	—
Glucoză	5 g	0,05 g
Peptonă	1 g	0,05 g
Extract drojdii	1 g	0,05 g
Streptomicină sulfat	—	0,5 g
Penicilină	—	0,5 g
Agar	—	30 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

A — Indicat pentru cultivarea *Chytridialelor* și B, pentru izolarea zoosporilor.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

42. **Cireşe-agar**

Extract de cireşe	300 ml
Agar	20 g
Apă	700 ml

Prepararea extractului : se scot sîmburii (se folosesc varietăţile cu fructe roşii) şi la fiecare 450 g (200 g după Booth, 1971a) se adaugă 1 000 ml apă. Se fierbe înăbuşit 2 ore. Se strecoară prin pînză şi se sterilizează o oră la 110°. Se păstrează în sticle sau flacoane. *Prepararea mediului :* se dizolvă agarul în apă şi se adaugă extractul. Se distribuie în vase de cultură sau în eprubete autoclavate anterior şi se sterilizează 5 minute la 120°. Se evită supraîncălzirea deoarece reacţia acidă a mediului (pH = 3,5—4,6) va împiedica solidificarea (Anonim, 1968). Acest mediu a fost imaginat la C.B.S.-Baarn. După Dade (1960) nu are merite speciale.

43. **Claussen-agar** (Claussen, 1912)

KH_2PO_4	0,05 g	Agar	3 g
NH_4NO_3	0,05 mg	Inulină	2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 g	Apă distilată	100 ml
$Fe_3(PO_4)_2$	0,001 g		

Se umple pe jumătate vasul Petri cu acest mediu. Se pune vasul într-unul ceva mai mare, dar de aceeaşi înălţime şi se umple spaţiul dintre vase cu acelaşi mediu, dar fără inulină. Mediul cu inulină se inoculează şi totul se acoperă. Fructificaţiile se vor forma în cîteva zile, în porţiunea fără inulină. Folosit pentru stimularea fructificării la *Ascomycetes*. Mai este cunoscut şi ca mediul lui Johansen pentru *Pyronema confluens* (Booth, 1971*a*).

44. **Conn-agar** (Booth, 1971 a)

	A	B
KNO_3	2 g	2,02 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,2 g	1,23 g
KH_2PO_4	2,7 g	2,72 g
Maltoză	7,2 g	—
Zaharoză	—	7,2 g
Dextroză	—	3,6 g
Amidon de cartofi	10 g	—
Agar	15 g	12 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

B — Cunoscut ca mediul lui Conn, folosit pentru izolarea lui *Fusarium*. Se adaugă verde malahit pentru a face o soluţie 1 : 40 000 sau violet de genţiană 1 : 26 000 (Booth, 1971a).

45. **Crabill** (Booth, 1971 a)

NH_4NO_3	10 g	Sucroză	50 g
K_2HPO_4	5 g	Agar	10 g
$MgSO_4$	2,5 g	Apă	1 000 ml

Recomandat pentru inducerea sporulării la *Coniothyrium pirinum*.

46 **Czapek-agar, Metoda 1** (Czapek, 1902 ; 1903)

$NaNO_3$	3 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
K_2HPO_4	1 g	Sucroză	30 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Agar	15 g
KCl	0,5 g	Apă distilată	1 000 ml

Mediu standard pentru identificarea speciilor de *Aspergillus* și *Penicillium*. A fost modificat de Dox (1910) care folosește 2 g de $NaNO_3$ și KH_2PO_4 în loc de K_2HPO_4 (formulă cunoscută ca „Czapek-Dox"), ceea ce are ca rezultat evitarea precipitării unor componente în timpul sterilizării, dar reacția mediului devine acidă, pH = 4,2 (Tuite, 1969; Raper & Fennell, 1965). Preparare: se dizolvă toate componentele, cu excepția fosfatului, în 500 ml apă, se adaugă sucroza, se dizolvă fosfatul separat și se adaugă la restul soluției. Se completează la un litru (Smith, 1971). Dacă se folosește apă distilată în recipiente de sticlă se va adăuga 0,01 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ și 0,005 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ la litru (Smith, 1949). Se sterilizează 20 minute la 121°. După Booth (1971 a), se fierb toate substanțele pe baie de apă timp de 15 minute și, cînd soluția s-a răcit, se adaugă sucroza și agarul, se topește agarul și se sterilizează.

Acha & Villanueva (1961) înlocuiesc $NaNO_3$ cu 3 g uree sau oxalat de amoniu și $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ cu 0,05 g $Fe_2(SO_4)_3$, în scopul favorizării formării periteciilor la *Aspergillus nidulans*. După Raper & Fennell (1965) $NaNO_3$ poate fi înlocuit cu NH_4NO_3.

După Bouhot & Billotte (1964) eliminarea sucrozei sau înlocuirea cu inulină 5—20 p. la 1 000 face mediul selectiv pentru izolarea lui *Fusarium oxysporum* și *F. solani* din sol. Sucroza poate fi înlocuită cu dextroză (Raper & Fennell, 1965) iar Gayed & Hassan (1966) au propus chiar folosirea gumei arabice în locul sucrozei. Pentru speciile care cer presiune osmotică mare, cum ar fi cele din grupul *Aspergillus glaucus*, se poate mări cantitatea de sucroză la 20, 40 sau chiar 60% (Raper & Fennell, 1965).

Adăugarea peptonei și a extractului de drojdii stimulează sporularea unor forme de *Aspergillus* (Raper & Fennell, 1965) iar introducerea de streptomicină 30 μg/ml și aureomicină 2 μg/ml previne creșterea bacteriilor (Warcup, 1963). Weary & Graham (1966) folosesc pentru cultivarea dermatofiților soluția Czapek fără agar, la care adaugă 2,5 g extract drojdii, 50 mg cloramfenicol, 500 mg cicloheximidă și 75 ml Tween 20.

Chace & Urlaub (1942) au obținut, la *Chaetomium globosum*, sporulare mai abundentă decît pe mediul Czapek, folosind următoarea variantă: 3 g $NaNO_3$, 1 g KH_2PO_4, 25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g KCl, 15 g agar și 10 g hîrtie de filtru la 1 000 ml apă de robinet, sau distilată, dar care conține urme de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Mediul „Verde malahit-Captan" — preparat prin adăugarea la mediul Czapek, după sterilizare, a unor soluții proaspete de verde malahit 50 mg, Captan 100 mg și Dicristicin (amestec de streptomicină-sulfat, penicilină procainică G și penicilină sodiu G) 0,75 mg — a fost folosit pentru izolarea selectivă a lui *Fusarium* (Singh & Nene, 1965) și *Pyrenochaeta terrestris* (Horton & Keen, 1966) din sol.

Mediul „Warcup" folosit pentru izolarea ciupercilor din sol, diferă de Czapek prin adăugarea a 0,5% extract drojdii și acidifierea cu acid fosforic la pH 4 (Warcup, 1950) iar mediul „Warcup modificat" prin adăugarea de 5 g bilă de bou, 1 g propionat de sodiu și 35 mg clorotetraciclină, ultima, după sterilizare. Valoarea pH-ului este 6,3 și mediul se sterilizează 15 minute la 117° (Papavizas & Davey, 1959).

47. **Czapek-agar,** Metoda 2 (B o o t h, 1971 a)

		Soluția A		*Soluția B*	
Soluție A	50 ml	$NaNO_3$	40 g	K_2HPO_4	20 g
Soluție B	50 ml	KCl	10 g	Apă distilată	1 000 ml
Sucroză	30 g	$MgSO_4$	10 g		
Agar	20 g	$FeSO_4$	0,2 g		
Apă distilată	900 ml	Apă distilată	1 000 ml		

Se dizolvă sucroza în 50 ml soluție *A* diluată cu aproximativ 500 ml apă. Se adaugă 50 ml soluție *B*, se completează la un litru, se adaugă agarul și se topește. Se sterilizează 20 minute la 121°.

Pentru *Penicillium* se recomandă (B o o t h, 1971 *a*) adăugarea de 40 g extract de malț, în felul următor : se dizolvă extractul de malț și agarul în apă, se adaugă soluția *A* și *B* și sucroza și se încălzește pe o baie de apă pînă la dizolvare. Se sterilizează 20 minute la 121°.

48. **Daniel & Rusch** (1961)

Triptonă „Difco"	10 g	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,084 g
Extract drojdii „Difco"	1,5 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.034 g
Glucoză, anhidră	10 g	Acid citric · H_2O	0,480 g
KH_2PO_4	2 g	HCl, concentrat	0,060 ml
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,6 g	Apă distilată pînă la 1 litru	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,6 g	$CaCO_3$	3 g
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	0,06 g	* Extract embrion găină	15 ml

* Fiole „Difco" conținînd 2 ml de extract 50% liofilizat se hidratează cu 8,3 ml apă distilată.

Folosit pentru cultivarea lui *Physarum polycephalum.*

49. **Dejecții de animale-agar** (L a n g e r o n & V a n b r e u s e g h e m, 1952 ; B o o t h, 1971 a)

Aproximativ 500 g de excremente parțial uscate, de cal, vacă, oaie sau iepure, se înmoaie în apă rece timp de 3 zile. Supernatantul se decantează și se diluează pînă capătă culoarea paiului, apoi se adaugă 2% agar și se sterilizează. După B r u m m e l e n (1967) producerea fructificațiilor este stimulată prin plasarea unui disc din hîrtie de filtru pe mediul agarizat sau prin adăugarea extractului de drojdii 3%. Temperatura favorabilă 23° iar pH-ul 6—7,5.

A — Dejecții de cal (L a n g e r o n & V a n b r e u s e g h e m, 1952). Se folosește bălegar proaspăt, fără particule de pămînt sau alte gunoaie. Se introduc bucăți de 7—8 cm înălțime, cu spatula, în eprubete largi, fără a atinge fața superioară. Se adaugă apă pînă se acoperă fragmentul introdus și se închide cu dop. Se sterilizează de două ori la 121° timp de 30 minute cu un interval de 24 ore. Recomandat pentru cultivarea și conservarea ciupercilor filamentoase iar ca decoct pentru cultivarea haplonților de *Coprinus.*

Dejecții de cal-agar (B u l l e r, 1931). Se fierb 200 g bălegar proaspăt de cal în 1 000 ml apă timp de 15 minute și se filtrează prin tifon. Se adaugă 12 g agar și se fierbe pînă se topește agarul. Se completează la 1 litru. Pentru a clarifica mediul se adaugă albușul de la 2 ouă și

coaja la 50 ml de apă și se amestecă. Se adaugă această soluție la decoctul de bălegar la 60°, se amestecă, se încălzește pe baie o oră și se filtrează prin vată.

B — Dejecții de iepure-agar. Se pun în flacoane sau vase Petri circa 6 bucăți la 15 ml mediu-agar (15 g agar la un litru apă). Se sterilizează 20 minute la 127°.

Agarul poate fi eliminat și atunci se pun cîte 3 fragmente în fiecare flacon sau cîte 6 în fiecare vas Petri și apă de robinet. Se sterilizează 20 minute la 127°. Recomandat pentru ciuperci coprofile (Anonim, 1968).

C — Dejecții de oaie-agar (Swartz, 1934)

Bălegar de oaie	300 g
Agar	15 g
Apă distilată	1 000 ml

Se fierbe bălegarul în apă pînă se desface. Se filtrează și se completează la un litru. Se adaugă agarul și se dizolvă. Se sterilizează 15 minute la 121°. Folosit pentru cultura lui *Pilobolus*.

50. **Dextroză-agar** (Sleeth, 1945)

Dextroză	10 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$NH_4H_2PO_4$	2 g	Agar	25 g
KNO_3	1 g	Apă distilată	1 000 ml

Agarul și dextroza se încălzesc și se dizolvă în 800 ml apă iar celelalte ingrediente se dizolvă în 200 ml apă. Se amestecă ambele soluții și se sterilizează 15 minute la 121°. Folosit pentru izolarea și purificarea culturilor pe *Pythium* de bacteriile contaminate prin răsturnarea stratului de mediu după inoculare (vezi pag. 91).

51. **Dextroză-extract drojdii** (Yegian & Kurung, 1941, citați de Benedek, 1950)

Dextroză	40 g	Apă distilată	1 000 ml
NaCl	8,5 g	Se ajustează la pH 4	
Extract drojdii „Difco"	2,5 g		

Este superior mediului Sabourand pentru izolarea ciupercilor din spută.

52. **Dextroză-fitonă-aureomicină-roz bengal** (Cooke, 1954)

Dextroză	10 g	Roz bengal (sau floxină)	0,035 g
Fitonă (sau peptonă)	5 g	Agar	20 g
KH_2PO_4	1 g	Apă	1 000 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Aureomicină	35 μg/ml

Colorantul se adaugă după dizolvarea ingredientelor și a agarului. Se sterilizează 20 minute la 121°. Preparare : se dizolvă 1 g aureomicină în 150 ml apă distilată și se păstrează în frigider. Se pun cu pipetă sterilă cîte 0,05 ml din această soluție în eprubetele de 10 ml cu mediu răcit la 45°. Recomandat pentru înlăturarea bacteriilor din culturile de ciuperci. Cantitatea de roz bengal poate fi mărită la 0,067 g/l (Smith, 1971). Mediile cu roz bengal nu trebuie expuse la lumină (Pady & al., 1960 ; Ottow, 1972).

53. **Dextroză-peptonă-extract drojdii (DPYA)** (Papavizas & Davey, 1959)

Dextroză	5 g
Peptonă	1 g
NH_4NO_3	1 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	urme
Extract drojdii	2 g
Bilă de bou	5 g
Propionat de Na	1 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml
Clorotetraciclină	20 mg
Streptomicină	30 mg

Se sterilizează 15 minute la 117°. Antibioticele se prepară în soluții proaspete, care se adaugă la mediul sterilizat și răcit la circa 45°. Recomandat pentru izolarea ciupercilor antagoniste din sol.

54. **Dick-agar** (Dick, 1965)

Glucoză	10 g
Amidon solubil	5 g
Extract drojdii	2 g
Na_2HPO_4	0,597 g
KH_2PO_4	2,043 g
K_2TeO_3	0,1 g
Agar	12 g
Apă distilată	1 000 ml

La preparare se folosește apă bidistilată în recipiente de sticlă. Recomandat pentru conservarea speciilor de *Saprolegniaceae*.

55. **Dox-agar** (Booth, 1971 a)

KNO_3	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
K_2HPO_4	0,5 g
$FeCl_2$	0,025 g
Sucroză	7,5 g
Agar	10 g
Apă	1 000 ml

Se dizolvă substanțele și se fierbe soluția pe baie de apă timp de 15 minute. Se răcește, se adaugă agarul și sucroza și se topește agarul. Se ajustează pH-ul și se sterilizează 20 minute la 127°.

56. **Drojdii (extract)**

	A	B	C	D	E	F
Extract drojdii	4 g	3 g	4 g	3 g	10 ml (sol. 1%)	10 g
Extract malț	10 g	3 g	—	3 g	—	—
Peptonă	—	5 g	—	5 g	—	20 g
Glucoză	—	200 g	20 g	10 g	—	20 g
Dextroză	4 g	—	—	—	—	—
K_2HPO_4	—	—	1 g	—	10 ml (sol. 0,1 M)	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	—	0,5 g	—	3 ml (sol. 10%)	—
NH_4NO_3	—	—	—	—	10 ml (sol. 10%)	—
NaOH	—	—	—	—	2—4 ml (sol. 0,1 M)	—
Agar	15 g	20 g	—	20 g	—	—
Apă distilată	cîte 1 000 ml la toate formulele					

Pappelis & Schmid (1965) au constatat că între sorturile de extract de drojdii există diferențe în ceea ce privește compoziția în elemente nutritive așa că, atunci cînd se utilizează, trebuie indicată marca sau sursa.

A — Mediu foarte potrivit pentru *Chaetomium* și alte *Ascomycetes* (Haynes & al., 1955).

B — Se sterilizează 20 minute la 121°. Recomandat da Raper & Fennell (1965) pentru stimularea sporulării și formarea cleistoteciilor la grupul *Aspergillus glaucus.*

C — Denumit și „YpG", folosit pentru producerea de zoosporangi la *Aphanomyces* (Emerson, 1959).

D — Mediu pentru demonstrarea aglutinării sexuale la unele levuri. Nu se ajustează pH-ul, iar pentru culturi agitate se folosesc 30 g glucoză.

E — Folosit pentru testarea activității ciupercilor celulozolitice asupra țesăturilor (Cooke & Busch, 1957).

F — Mediul „Shaker", poate fi solidificat prin adăugarea a 20 g agar. Nu este necesară ajustarea pH-ului.

57. Drojdii (extract)-amidon solubil

	A	B
Extract drojdii „Difco"	4 g	3 g
Amidon solubil	15 g	10 g
K_2HPO_4	1 g	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	0,2 g
Agar	20 g	15 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

A — Mediul „Emerson" sau „YpSS", folosit pentru studierea ciclului de dezvoltare și taxonomia speciilor de *Allomyces* și altor ciuperci acvatice (Emerson, 1941).

B — Mediul „Hara-Itô" recomandat pentru creștere și sporulare la *Guignardia laricina* (Itô & Hayashi, 1971).

58. Elliott-agar (Elliott, 1917)

KH_2PO_4	1,36 g	Asparagină	1 g
Na_2CO_3	1,06 g	Agar	15 g
$MgSO_4$	0,50 g	Apă distilată	1 000 ml
Dextroză	5 g		

Se dizolvă agarul prin încălzire, se adaugă ingredientele și se completează volumul.

59. Entomophthora muscae (Srinivasan & al., 1964)

Extract de boabe de grîu	30 g	Glicerină	10 g
Peptonă	20 g	Agar	20 g
Extract drojdii	10 g	Apă de robinet	1 000 ml

Se fierb boabele de grîu în 500 ml apă timp de o oră, se decantează extractul și se adaugă celelalte ingrediente afară de agar. Se topește agarul în 500 ml apă și se amestecă cele două lichide, se filtrează și se ajustează pH-ul la 7 cu o soluție de NaOH, înainte de sterilizare.

BCU MICROBIOLOGIA UNIVERSITY LIBRARY

60. Fasole-agar

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Fasole (g)	100	50	15	18	215	5	283	150—250	30	400	200	30
Sucroză (g)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—
Dextroză (g)	—	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glucoză (g)	—	2,5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Extract malţ (g)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—
Extract drojdii (g)	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Agar (g)	15—20	20	10	5	10	20	40	15—20	20	20	17	10
Apă distilată (ml)	1 000	1 000	800	1 000	285	1 000	2 000	1 000	1 000	1 000	1 000	500

A — Fasole lima *(Phaseolus lunatus)* proaspătă sau îngheţată se umectează într-un litru de apă călduţă timp de 30 minute. Se înlătură lichidul şi se completează cu apă, se filtrează prin sită, se adaugă agarul şi se fierbe pînă la topirea agarului. Recomandat pentru cultivarea lui *Phytophthora infestans* (Riker & Riker, 1936; Altman, 1966). Adăugarea de Benomil, penicilină şi polimixină favorizează izolarea speciilor de *Pythium* şi *Phytophthora* din sol (Follin, 1971).

B — Fasole albă „Great Northern" se sterilizează în 500 ml apă, se adaugă agarul topit şi glucoza (Buddenhagen, 1958).

C — Făină de fasole lima, măcinată foarte fin, se introduce în 800 ml apă şi se sterilizează 45 minute la 121°. Se amestecă cu celelalte ingrediente şi se sterilizează din nou 30 minute. Recomandat pentru creşterea şi conservarea lui *Phytophthora infestans* (Thurston, 1957).

D — Se foloseşte fasole lima şi este indicat pentru inducerea sporulării la *Rhynchosporium secalis* şi *R. orthosporum* (Schein & Kerelo, 1956).

E — Se foloseşte suc de fasole din conserve de fasole verde. Recomandat pentru stimularea formării conidiilor la *Colletotrichum lindemuthianum* (Romanowski & Kuć, 1962).

F — Se prepară din seminţe de fasole lima, uscate. Se sterilizează împreună cu agarul timp de 20 minute şi apoi din nou în eprubete. Folosit pentru creşterea culturilor de rezervă la *Phytophthora megaspermum* var. *sojae* (Hilty & Schmitthenner, 1962).

G — Fasole conservată prin îngheţare se încălzeşte într-un litru de apă timp de 20—30 minute, se filtrează printr-o pînză de bumbac, se completează la 2 litri, se adaugă agarul şi se sterilizează 15 minute la 121°. Favorizează producerea de sporangi şi oospori la diferite specii de *Phytophthora* (Harnish, 1965).

H — Seminţe de fasole lima conservate prin îngheţare se pun în apă şi se adaugă agarul topit. Stimulează producerea de oospori la *Phytophthora infestans* şi *P. sojae*. Mediul trebuie păstrat la întuneric deoarece devine fungistatic (Smoot & al., 1958; Calvert & al., 1960).

I — Seminţe de fasole roşie, uscate, se macină şi apoi se fierb timp de 5 minute. Se filtrează şi se adaugă agarul topit. După 8 zile se scot discuri din cultură şi se introduc în extract de sol nesteril (Wills). Induce formarea de sporangi la *Phytophthora cinnamomi* şi formarea de zoospori la *P. fragariae* (Stamps, 1952; Hickman & Goode, 1953; Converse & Sheroishi, 1962; Royle & Hickman, 1964).

J — Se folosesc boabe de fasole verde, măcinate. Stimulează producerea de conidii la *Colletotrichum orbiculare* (Goode, 1958; Littrell & Epps, 1965).

K — Se face un extract din păstăi de fasole în apă distilată. Recomandat pentru formarea conidiilor la *Diplocarpon earlianum*. Cunoscut sub denumirea de „BPSMA" (Dhanvantari, 1967).

L — Fasole uscată se sfărîmă, fără a fi transformată în pulbere. Se pune fasolea și apa într-un pahar și se încălzesc pe o baie de apă pînă la fierbere, agitînd din cînd în cînd soluția. Se adaugă agarul și se fierbe 5 minute. Se strecoară prin muselină, trecînd cît mai mult material. Se corectează pH-ul și se sterilizează 20 minute la 127°. Cantitatea de agar poate varia de la 10 la 30 g (Booth, 1971a).

61. **Fitonă-dextroză-agar**

	A	B
Fitonă „BBL"	15 g	10 g
Dextroză	15 g	10 g
Extract drojdii	1 g	—
Agar	17 g	16 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

A — Folosit pentru inducerea sporulării la *Stemphyllium bolicki* (Sobers & Seymour, 1963).

B — Denumit și „Mycophil agar", recomandat pentru cultivarea ciupercilor patogene la om și animale și pentru teste de activitate antifungică. Acidifiat este potrivit pentru numărători de mucegaiuri și drojdii în industria băuturilor, vitaminelor și a altor preparate (Anonim, 1959).

62. **Fîn (extract)-agar** (Both, 1971a)

Fîn	200 g	Agar	20 g
Glucoză	5 g	Apă distilată	1 000 ml

Se cîntărește fînul și se fierbe 30 minute în 500 ml apă. Se decantează și se adaugă glucoza la lichid. Se completează la un litru, se adaugă agarul și se încălzește pînă se dizolvă. Se sterilizează 20 minute la 121°.

63. **Fîn (infuzie)-agar** (Raper, K. B., 1937)

Infuzie de fîn	1 000 ml
K_2HPO_4	2 g
Agar	15—20 g

Se ajustează pH-ul la 6,2 cu soluție de HCl 10%. Se sterilizează 20 minute la 121°. Prepararea infuziei: la 1 000 ml apă distilată se adaugă 35—50 g fîn în descompunere. Se sterilizează 30 minute la 121°, se strecoară prin pînză, se filtrează și se completează la 1 000 ml. Koch (1968) folosește apa de robinet și îl recomandă pentru *Myxomycetes* și *Mucor*. După Raper & Fennell (1965) stimulează sporularea la *Aspergillus sparsus* și este util pentru izolarea speciilor de *Aspergillus* din sol sau alte substraturi naturale.

64. **Fomes annosus** (Kuhlman & Hendrix, 1962)

Peptonă-Bacto	5 g	Agar	20 g
$MgSO_4$	0,25 g	Apă	1 000 ml
K_2HPO_4	0,5 g	* Streptomicină	100 ppm
Pentaclornitrobenzen (PCNB)	190 ppm	* Acid lactic (50%)	2 ml
		* Alcool etilic (95%)	20 ml

* Se adaugă după sterilizare cînd temperatura mediului a ajuns la 41—45°.

Mediu selectiv folosit pentru izolare.

65. **Fothergill** (Fothergill & Yeoman, 1957)

Sucroză	4% (sol. în apă)	Zn	2 ppm
K_2HPO_4	0,48 M	Fe	2 ppm
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,012 M	Mn	2 ppm
$(NH_4)_2SO_4$	0,025 M		

Pentru înlăturarea precipitării, soluția de fosfat de potasiu, sterilă, se va adăuga după sterilizare. Folosit pentru studiul nutriției minerale la *Rhizopus stolonifer*.

66. **Fries** (1938)

Tartrat de amoniu	5 g
NH_4NO_3	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
KH_2PO_4	11,3 g
K_2HPO_4	2,6 g
Glucoză	20 g
Extract drojdii	5 g
Sol. microelemente	2 ml
Apă	1 000 ml

Soluție microelemente :

LiCl	167 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	107 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	72 mg/l
H_2MoO_4	34 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	80 mg/l

67. **Fries-modificat, I**

	A	B
Tartrat de amoniu	5 g	—
NH_4NO_3	1 g	5 g
KH_2PO_4	1 g	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	0,5 g
NaCl	0,1 g	0,1 g
$CaCl_2$	0,1 g	0,1 g
Glucoză	—	20 g
Sucroză	10 g	—
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	—	4,43 mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	—	4,00 mg
Aneurină	—	100 µg
Piridoxină	—	100 µg
d-Boitină	4 mg	—
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

A — Se mai adaugă la fiecare litru de mediu următoarele microelemente : B, 10 mg ; Cu, 100 mg ; Fe, 200 mg ; Mn, 20 mg ; Mo, 20 mg ; Zn, 200 mg (Ryan, 1950).

B — Folosit pentru cultivarea speciilor de *Hyphomycetes* acvatice (Nilsson, 1964). Este o modificare a mediului descris de Fries (1949).

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

68. **Fries-modificat, II** (Sundstrom, 1964)

Soluția 1	A	B	C	D
D-Glucoză	20 g	20 g	20 g	10 g
L-Asparagină · H_2O	1,4 g	1 g	—	—
KH_2PO_4	0,35 g	0,35 g	—	—
K_2HPO_4	0,15 g	—	0,15 g	0,75 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	—	4,1 g	—
$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$	0,5 g	0,5 g	0,5 g	—
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	—	7,5 g	—	—
NH_2NO_3	—	—	0,6 g	—
Tartrat de amoniu	—	0,5 g	—	—
NaCl	—	—	—	1 g
$MgSO_4$	—	—	—	1,5 g
Acizi casaminici	—	—	—	5 g
Acid citric · H_2O	—	6,17 g	—	—
Citrat feric	—	—	—	0,02 g
Aneurină	0,1 g	0,1 mg	0,1 mg	0,1 mg
Soluție vitamine	—	—	—	1 ml
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

Soluția 2	
CaCl	0,10 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,41 g
Citrat feric	5,31 mg
Acid citric	5,31 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	4,43 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,05 mg
Apă distilată	50 ml

Soluția de vitamine (sol. stoc)	mg/ml
Riboflavină	0,20
Piridoxină	0,15
Niacină	0,15
Pantotenat de Ca	0,15
Acid d-aminobenzoic	0,20
Biotină	0,01
Inozitol	0,40
Colină	1,00
Acid folic	0,02

La mediile *A*, *B* și *C* se adaugă și soluția 2. Dacă este necesar se poate adăuga 12 g agar. Soluțiile 1 și 2 se sterilizează separat 5—10 minute la 110—120°. Soluția de vitamine se sterilizează prin filtrare.
Mediul *B* va avea pH-ul 4,2, mediul *C* se va ajusta cu HCl la 4,2 iar mediul *D* se ajustează la 6 cu tampon Veronal (acid dietil barbituric 0,575 g; dietil-barbiturat de Na 0,375 g; NaCl 8,5 g și apă distilată 1 000 ml).
Mediile reprezintă modificări ale celor descrise de Fries (1955) și au fost folosite de Sundstrom (1964) pentru studii de fiziologie la *Exobasidium.*

69. **Glicerină-agar** (Pailey & al. citați de Booth, 1971 a)

Glicerină	7,5 g	KH_2PO_4	0,06 g
Zahăr din trestie	7,5 g	NaCl	4 g
Peptonă	5 g	Agar	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g	Apă	1 000 ml

Se pune glicerina, zahărul, sulfatul de magneziu și fosfatul de potasiu în 200 ml apă. Se amestecă peptona și sarea cu 200 ml apă la 60° și se adaugă la prima soluție. Se dizolvă agarul în 600 ml apă și apoi se amestecă totul. pH-ul nu necesită ajustare. Se sterilizează 20 minute la 121°. Recomandat pentru *Aspergillus.*

70. **Glucoză, I** (Gindrat, 1965)

Glucoză	20 g	Soluţie oligoelemente	1 ml
KNO_3	1,5 g	Aneurină	0,2 mg
KH_2PO_4	1,5 g	Biotină	0,005 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Apă distilată	1 000 ml
$FeCl_3$ (soluţie 1%)	6 picături		

pH = 5,5

Pentru soluţia de oligoelemente (microelemente) vezi mediul nr. 141. Folosit pentru cultivarea lui *Gaeumannomyces graminis*.

71. **Glucoză, II** (Klausmeier & al., 1963)

Glucoză	3%	$FeSO_4$	$7,2 \times 10^{-6}$ M
NH_4NO_3	$37,5 \times 10^{-3}$ M	$ZnSO_4$	7×10^{-6} M
KCl	$3,35 \times 10^{-3}$ M	$MnSO_4$	$5,9 \times 10^{-6}$ M
K_2HPO_4	$14,7 \times 10^{-3}$ M	NaCl	$85,5 \times 10^{-6}$ M
$MgSO_4$	$8,44 \times 10^{-3}$ M		

Se ajustează la pH = 6,8 înainte de sterilizare. Recomandat pentru creşterea ciupercilor folosite în testarea rezistenţei materialelor.

72. **Glucoză-acizi casaminici** (Dimond & al., 1949)

Glucoză	15 g
Acizi casaminici	1,5 g
Extract drojdii	1 g
KH_2PO_4	1,5 g
$MgSO_4$	1 g
Soluţia de microelemente din sol. Hoagland	10 ml

Soluţie microelemente (Hoagland & Aron, 1950).

	g/l
H_3BO_3	2,86
$MnCl_2$	1,81
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08
$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,01

Folosit pentru stimularea sporulării la *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

73. **Glucoză-alanină-agar** (Madelin, 1956)

Glucoză	10 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
dlα-Alanină	1 g	Agar	20 g
Clorhidrat de aneurină	500 μg	Apă distilată	1 000 ml
K_2HPO_4	2 g		

Recomandat pentru producere de fructificaţii la *Coprinus lagopus*.

74. **Glucoză-asparagină-agar**

	A	B	C	D
Glucoză	10 g	30 g	2 g	40 g
Asparagină	0,5 g	1 g	2 g	4 g
K_3PO_4	—	—	1,25 g	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,5 g	0,75 g	2 g
K_2HPO_4	0,5 g	1,5 g	—	4 g
$(NH_4)_2HPO_4$	—	—	—	2 g
$CaCO_3$	—	—	—	0,25 g
$CaCl_2$	—	—	—	0,1 g
Agar	15 g	—	15 g	15 g
Apă pînă la	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

A — Mediul „Krainsky" folosit pentru stimularea producției de peritecii la *Penicillium luteum*. Se dizolvă glucoza, asparagina și K_2HPO_4 în apă și se adaugă agarul. Se fierbe pînă la dizolvare. Se sterilizează 30 minute la 110° (Booth, 1971 a).

B — Rețetă derivată din analiza tuberculilor de cartofi și folosită pentru înlocuirea mediului cartof-dextroză-agar, cel puțin pentru unele specii de *Fusarium* (Brown, 1925).

C — Recomandat pentru testarea producerii de aneurină (Lilly & Barnett, 1951).

D — Mediul Pieper, Humphrey & Acree (1917) folosit pentru cultivarea ciupercilor care produc putregaiul lemnului.

75. Glucoză-asparagină-sterol (Cuppett & Lilly, 1973)

D-glucoză	0,5 g	Cu^{+2}	0,002 mg
L-asparagină (anhidră)	0,5 g	Mn^{+2}	0,05 mg
KH_2PO_4	1 g	Mo^{+6}	0,01 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	β-sitosterol	10 mg
Zn^{+2}	0,2 mg	Aneurină	100 µg
Ca^{+2}	10 mg	Apă distilată	1 000 ml

Se adaugă o soluție 2% de αα-dipiridil în 10% acid acetic și 200 mg/l acid ascorbic.
Folosit pentru studierea nutriției la *Phytophthora infestans*.

76. Glucoză-azotat-sterol (Hendrix, 1965)

Glucoză	5,4 g	Agar	17 g
$NaNO_3$	1,5 g	Aneurină HCl	
KH_2PO_4	1 g	(sol. stoc de 1 000 ppm)	2 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Apă distilată	1 000 ml

Se ajustează la pH 6 și se sterilizează 10 minute la 121°. Se prepară o soluție din 20 mg sterol (oricare dintre : ergosterol, fitosterol, colesterol, stigmasterol sau β-sitosterol) în 2 ml eter și se toarnă la suprafața mediului, în vase Petri. Se poate inocula după cîteva ore și se incubează la întuneric. Folosit pentru a studia efectul sterolilor asupra creșterii și reproducerii la specii de *Pythium* și *Phytophthora*.

77. Glucoză-bere (Moyer & al., 1937)

	A	B
Glucoză	91,3 g	50 g
$(NH_4)_2HPO_4$	—	0,56 g
NH_4NO_3	0,45 g	—
KH_2PO_4	0,72 g	0,144 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,06 g	0,12 g
Peptonă	—	0,20 g
Bere	60 ml	45 ml
Apă distilată la	1 000 ml	1 000 ml

A — Se sterilizează 20 minute la 120°. Poate fi folosit și ca mediu solid prin adăugarea de $CaCO_3$, 0,5 g/l și agar 30 g/l. Recomandat pentru stimularea sporulării la *Aspergillus niger* (Raper & Fennell, 1965) ca și formula modificată, *B*.

78. Glucoză-extract drojdii-agar

	A	B
Glucoză	10 g	20 g
Extract drojdii	3 g	2 g
Peptonă	—	5 g
K_2HPO_4	2 g	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g	—
Agar	20 g	20 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

A — Indicat pentru producerea de fructificații la *Coprinus lagopus* (Madelin, 1956). Se recomandă sterilizarea separată a glucozei și K_2HPO_4.

B — Folosit pentru cultivarea lui *Harposporium* (Aschner & Kohn, 1958).

79. Glucoză-hidrolizat de cazeină

	A	B
Glucoză	25 g	10 g
Hidrolizat de cazeină	*	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	1 g
KH_2PO_4	1 g	—
K_2HPO_4	—	2 g
Acid fumaric	1,32 g	—

	A	B
NaCl	—	0,2 g
$CaCl_2$	—	0,2 g
Na_2CO_3	1,12 g	—
Mn } ca sulfați	0,1 mg	—
Fe } ca sulfați	0,2 mg	5 mg
Zn } ca sulfați	0,2 mg	5 mg
Apă distil. pînă la	1 000 ml	1 000 ml

* Echivalentul a 2 g cazeină.

A — Mediu propus de Lilly & Barnett (1951). *B* — Mediu de bază pentru studiul nutriției la *Dipodascus uninucleatus* (Dulaney & Grutter, 1950).

80. Glucoză-peptonă-agar

	A	B	C
Glucoză	10 g	165 g	10 g
Peptonă	2 g	1 g	5 g
KH_2PO_4	0,5 g	0,06 g	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	0,05 g	0,5 g
KNO_3	—	0,5 g	—
Tartrat de Fe	—	0,04 g	—
Roz bengal	—	—	33 mg
Streptomicină	—	—	30 mg
Agar	15 g	25 g	15 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Se sterilizează 15 minute la 121°. Indicat pentru producerea de conidii la *Colletotrichum musae*, cultivat la 27—30° (Goos & Tschirsch, 1963).

B — Se sterilizează 20 minute la 121°. După Raper & Fennell (1965) a fost preparat de Moyer (nepublicat) și favorizează sporularea la *Aspergillus glaucus*.

C — Se sterilizează 15 minute la 117°. Recomandat pentru izolarea primară a ciupercilor din sol (Kaufman & al., 1963).

81. Goldstein & Moriber (1966)

KCl	70 mg
K_2HPO_4	43 mg
$CaCl_2$	47 mg
NaCl	2,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,8 g
Hidrolizat de cazeină	0,2 g
Glucoză	0,4 g
Agar	0,1 g
Clorhidrat de aneurină	20 μg
Vitamina B_{12}	0,3 μg
Na_2EDTA	1 mg
B (ca H_3BO_3)	0,2 mg
Fe (ca $FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0,19 mg
Mn (ca $MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,1 mg
Mo (ca $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,09 mg
Zn (ca $ZnCl_2$)	0,06 mg
Co (ca $CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1 μg
Cu (ca $CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	2 μg

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se completează la 900 ml cu apă distilată în recipiente de sticlă. După sterilizare pH-ul va fi = 7,3. Folosit pentru cultivarea lui *Dermocystidium.*

82. **Grigoraki** (Benedek, 1940)

Peptonă	10 g
Maltoză	20 g
Agar	18 g
Lapte	500 ml
Apă	500 ml

Recomandat pentru conservarea dermatofiților. După cîteva zile de la inoculare se adaugă la fiecare eprubetă 4—5 ml lapte steril, se închid tuburile cu cauciuc și se păstrează la temperatură scăzută.

83. **Grîu (paie)-agar** (Watson, 1961)

$NaNO_3$	3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Se sterilizează și se toarnă în vase Petri. Înainte de solidificare se presară pe suprafața mediului paie de grîu tocate mărunt, sterilizate în prealabil cu oxid de propilen. După Watson (1961) numai *Pyrenochaeta* produce un pigment roz pe acest mediu care, din acest motiv, este foarte util pentru diagnosticare.

84. **Grîu (embrioni)-agar**

	A	B
Embrioni de grîu	50 g	100 g
Extract de malț	10 g	—
Agar	20 g	15 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

A — Se fierb embrionii în apă timp de 20—30 minute, se filtrează prin muselină, se completează la 1 000 ml, se adaugă și se dizolvă agarul. Se sterilizează 30 minute la 104°. Propus de Ponchet (1965) și completat de Rapilly (1968).

B — Mediu pentru cultivarea lui *Acremonium.* Se fierb embrionii în apă timp de 20 minute, după care se răcește soluția, se centrifughează 20 minute la 2 000 rot/min., se filtrează, se adaugă agarul. Prin adăugarea de 0,1% glucoză se stimulează creșterea levurilor (Pisano & al. 1962).

85. **Grîu (făină)-agar**

Făină de grîu	40 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Deoarece făina de grîu conține circa 10% protide nu este necesară adăugarea peptonei (Langeron & Vanbreuseghem, 1952). După Smith (1971) conține mai mult azot decît mediul cu făină de porumb și multe ciuperci au o creștere mai tipică pe acest mediu.

86. **Gumă arabică** (Gayed & Hassan, 1966)

Gumă arabică (pulbere)	20—40 g
Apă	1 000 ml

Guma arabică este un polizaharid complex conținînd Mg, K, N și Ca. A fost folosit cu succes pentru creșterea lui *Rhizopus stolonifer, Aspergillus niger* și *Rhizoctonia solani.* Rezultate mai bune se obțin prin folosirea gumei ca înlocuitor al sucrozei în mediul Czapek.

87. **Graminee (frunze)-agar** (T u i t e, 1969)

Frunze tăiate mărunt	150 g
Agar	12 g
Dextroză	10 g
Apă	1 000 ml

Se face un decoct din frunze de *Dactylis glomerata* sau *Phleum pratense*, prin fierbere și filtrare prin tifon. Este folosit pentru inducerea sporulării la *Cercosporidium graminis*.

88. **Hansen** (B o o t h, 1971 a)

Peptonă	1 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Maltoză	5,9 g	Apă	1 000 ml
KH_2PO_4	0,3 g		

Folosit pentru cultivarea levurilor.

89. **Harrold** (1950)

Extract malț	20 g
Sucroză	400 g
Extract drojdii „Difco"	5 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Se sterilizează 20 minute la 120°. Recomandat pentru creșterea și formarea ascosporilor la *Eremascus*. După R a p e r & F e n n e l (1965) unele specii de *Aspergillus* sporulează și formează cleistotecii pe acest mediu.

90. **Hayduk (soluția)** (T h o m, 1930)

K_2HPO_4	1 g	Sucroză	80 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,32 g	Apă	1 000 ml
Asparagină	0,80 g		

91. **Hîrtie de filtru-extract drojdii-agar** (I n g o l d & D r i n g, 1957).

Hîrtie de filtru	12 g
Extract drojdii	4 g
Agar	24 g
Apă de robinet	1 000 ml

Hîrtia de filtru se fragmentează și se dispersează în apă cu un mixer. Recomandat pentru producerea de peritecii la *Sordaria*.

92. **Hodgson** (1958)

K_3PO_4	1 g	L-asparagină	1 g
$MgSO_4$	1 g	Aneurină	0,2 mg
Dextroză	5 g	Apă distilată	1 000 ml
$FeCl_3$	1 mg		

Se ajustează pH-ul la 6,3—6,5, cu soluție diluată de NaOH sau HCl și se sterilizează 10 minute la 116°.

Folosit pentru diferențierea raselor la *Phytophthora infestans*.

93. **Horne & Mitter** (1927)

Glucoză	2 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,75
Amidon cartofi	10 g	Agar	15 g
Asparagină	2 g	Apă	1 000 ml
K_3PO_4	1,25 g		

Pentru cultivat *Fusarium*.

94. **Hotson** (1942)

Amidon	30 g	Peptonă	5 g
Malț	10 g	Dextroză	10 g
Agar	15 g	Apă distilată	1 000 ml

Recomandat pentru cultivarea speciilor de *Arthrinium*.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

95. **Jones** (1972)

	A	B	C	D	E	F	G	H
Czapek-Dox bulion „Difco"	36 g	36 g	36 g	—	—	—	—	—
Bacto agar „Difco"	10 g	10 g	10 g	—	—	—	—	—
Czapek-Dox agar „Oxoid"	—	—	—	45 g	45 g	45 g	45 g	45 g
Extract drojdii „Difco"	2 g	1 g	2 g	—	—	—	—	—
Extract drojdii „Oxoid"	—	—	—	2 g	2 g	2 g	—	—
Peptonă „Evans"	2 g	1 g	2 g	—	—	—	—	—
Peptonă micologică „Oxoid"	—	—	—	2 g	2 g	—	2 g	—
Hidrolizat de cazeină „BDH"	—	—	—	2 g	—	—	—	2 g
Hidrolizat de cazeină „Oxoid"	—	—	—	2 g	—	—	—	2 g
pH	—	6,1	6,2	6,3	6,3	6,4	6,4	6,5

Folosite pentru creşterea lui *Uromyces dianthi.* Se obţin uredospori, pe plante sau frunze detaşate şi se transferă aseptic pe unul din aceste medii. Incubarea la 18° în întuneric.

96. **Kauffman** (B o o t h, 1971 *a*)

Maltoză	5 g	KH_2PO_4	0,25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,10 g	Agar	15 g
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0,50 g	Apă	1 000 ml

97. **Kerr & Sussman** (1958)

Peptonă, Bacto	2 g	KH_2PO_4	0,3 g	Mediul are pH-ul 6—6,3 şi este folosit pentru cultivarea *Myxomycetelor.*
Glucoză	2 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g	
Extract drojdii	0,2 g	Agar	20 g	
K_2HPO_4	0,2 g	Apă distilată	1 000 ml	

98. **Knop** (soluţia)

	A	B
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0,5 g	0,8 g
KNO_3	0,125 g	0,2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,125 g	0,2 g
KH_2PO_4	0,125 g	0,2 g
$FeCl_2$	0,005 g	urme
Agar	—	20 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

A — Hîrtie de filtru, saturată cu soluţia Knop la care s-a adăugat agar, se foloseşte pentru conservarea speciilor de *Chaetomium* (B o o t h, 1971 *a*). *B* — Favorabil germinării şi creşterii unor *Myxomycete* (A l e x o p o u l o s, 1960).

99. **Knox-Davis** (1965).

La mediul apă-agar 2% se adaugă o cantitate mică de făină de arachide *(Arachis hypogaea).* Se sterilizează 15 minute la 121°. Recomandat pentru producerea de picnidii la *Macrophomina phaseolina.* Culturile se expun la „black-light".

100. **Ko & Hora** (1971)

K_2HPO_4	1 g	Dexon (sodium paradimetilaminobenzen-diazosulfonat)	90 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Cloramfenicol	50 mg
KCl	0,5 g	Streptomicină (sulfat)	50 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg	Agar	20 g
$NaNO_2$	0,2 g	Apă distilată	1 000 ml
Acid galic	0,4 g		

Favorizează izolarea lui *Rhizoctonia solani* din sol, prin inhibarea celorlalte microorganisme.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

101. Kuehner (1951)

Dextroză	20 g	$CaCl_2$ (anhidră)	0,33 g	Se folosesc numai substanțe chimic pure. Indicat pentru studierea efectelor vitaminelor și microelementelor, asupra creșterii și producerii de acetat de etil de către *Hansenula anomala.*
Asparagină	2 g	$(NH_4)_2SO_4$	2 g	
KH_2PO_4	1,5 g	KI	0,1 mg	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Apă bidistilată	1 000 ml	

102. Lactoză-hidrolizat de cazeină (Malca & Ullstrup, 1962)

Lactoză	37,5 g
Hidrolizat de cazeină	3 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Soluție microelemente	2 ml
Agar	10—15 g
Apă deionizată	1 000 ml

Soluție microelemente :

$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	723,5 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	439,8 mg
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	203,0 mg

Se dizolvă pe rînd în 1 l apă și se adaugă acid sulfuric pentru a obține o soluție limpede.

Se ajustează pH-ul la 6. Mediu favorabil pentru sporularea lui *Helminthosporium turcicum, H. carbonum* și probabil alte specii de *Helminthosporium.*

103. Lange (1952)

Decoct de bălegar de cal	100 ml	Peptonă	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Maltoză	5 g
$Ca(NO_3)_2$	0,5 g	Agar	10 g
KH_2PO_4	0,25 g	Apă distilată	900 ml

Este o modificare a mediului Kauffman. Decoctul se prepară prin fierberea unei cantități mici de bălegar proaspăt în 150 ml apă, timp de 1—2 minute. Recomandat pentru creșterea speciilor de *Coprinus.* Eilers (1972) elimină azotatul de calciu și înlocuiește decoctul de bălegar cu 100 g extract de hrană pentru cîini „Purina dog Chow" produs de Ralston-Purina Co., St. Louis.

104. Lapte-agar (Tomsoff, 1959)

Lapte praf	2 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Folosit pentru izolarea ciupercilor nematodofage din sol. Se presară un gram de sol sau mai puțin pe suprafața mediului.

105. Legume (ulei)-azotat-agar (Hendrix & Apple, 1964; Hendrix 1967)

Ulei de legume „Wesson"	0,5—2 ml
$NaNO_3$	1,5 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Clorhidrat de aneurină (sol. 1 000 ppm)	2 ml
Agar	17 g
Apă distilată (cu pH ajustat la 6 înainte de sterilizare)	1 000 ml

Se agită agarul înainte de turnare pentru a dispersa uleiul. Majoritatea speciilor de *Pythium* și *Phytophthora* produc sporangi împrejurul picăturilor. Tuite (1969) remarcă creșterea foarte limitată a lui *Phytophthora megasperma* var. *sojae,* pe acest mediu.

BCU CLUJ CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

106. **Leonian-agar** (Leonian, 1924)

	A	B	C
KH_2PO_4	1,25 g	1 g	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,625 g	0,5 g	0,5 g
NaCl	—	—	70 g
Peptonă	0,625 g	1 g	1 g
Maltoză sau glucoză	6,25 g	—	—
Dextroză	—	15 g	20 g
Extract malţ	6,25 g	5 g	5 g
Agar	20 g	15 g	25 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Formulă modificată de Bonnar (Booth, 1971 *a*). După Cooke (1963) peptona poate fi înlocuită cu neopeptonă sau polipeptonă. Este util pentru obţinerea de fructificaţii la unele ciuperci şi este un mediu standard pentru studiul culturilor de *Ascomycetes* şi *Sphaeropsidales*.

B — Recomandat de Mehrlich (1934) pentru cultivarea speciilor saprofite de *Deuteromycotina* ca şi a diferitelor specii de *Pythium* şi *Phytophthora*.

C — Formula lui C. M. Christensen (Rogerson, 1958).

107. **Levuri (mediu standard)** (Beech & Davenport, 1971)

Suc de mere depectinizat	100 ml
Aneurină	1 mg
Agar (Ionagar)	3 g

Se ajustează pH-ul la 4,8, se sterilizează 15 minute la 110°. Se păstrează la 5°.

108. **Littman** (1947)

Bilă de bou, deshidratată	15 g
Peptonă	10 g
Dextroză	10 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Se încălzeşte pînă se dizolvă, se ajustează pH-ul la 7 şi se adaugă 10 ml soluţie 0,1% de cristal violet. Se sterilizează 10 minute la 116°. Înainte de turnare în plăci se răceşte la 46—50° şi se adaugă 300—500 μg streptomicină, la fiecare 100 ml mediu. După Tuite (1969), 1,25 g cristal violet se dizolvă în 25 ml alcool 95%, se păstrează în flacoane bine închise şi se adaugă cîte 0,2 ml/l mediu.

Mediu foarte folosit pentru izolarea primară a ciupercilor zoopatogene, în special a dermatofiţilor (Gupta & Singh, 1970) şi pentru înlăturarea bacteriilor contaminante din culturile de ciuperci.

109. **Loquin** (1948)

$NaHCO_3$	0,1 g	Ergosterol	0,5 g	Leucină	0,2 g
NaCl	0,6 g	Aneurină	0,1 g	Alanină	0,2 g
$CaCl_2$	0,1 g	Acid para-aminobenzoic	0,1 g	Tirozină	0,2 g
KCl	0,1 g	Acid indolilacetic	0,1 g	Glicocol	0,3 g
KH_2PO_4	2 g	Xiloză	3 g	Agar	30 g
Tiouree	0,2 g	Levuloză	6 g	Apă	1 000 ml

 Pentru conservarea *Myxomicetelor*, sub formă de plasmodii, la 20—26°.

110. Lucernă (decoct)-agar (Graham & al., 1963)

Frunze de lucernă	150 g
Dextroză	10 g
Agar	12 g
Apă pînă la	1 000 ml

Se fragmentează frunzele de lucernă *(Medicago)* în apă, într-un mixer, se filtrează prin tifon și se adaugă la agarul care a fost topit împreună cu glucoza. Recomandat pentru inducerea sporulării la *Cercosporidium graminis.*

111. Lukens & Sisler (1958)

Glucoză	20 g	Piridoxină	10 µg
$(NH_4)_2SO_4$	3 g	Acid folic	10 µg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g	*Bo	0,01 ppm
KH_2PO_4	3 g	*Zn	0,07 ppm
Glicină	1 g	*Cu	0,01 ppm
Clorhidrat de aneurină	20 µg	*Mo	0,01 ppm
Niacină	20 µg	*Fe	0,05 ppm
Biotină	1 µg	Apă distilată pînă la	1 000 ml
i-inozitol	200 µg		

* Soluția de microelemente a lui Burkholder (1943).

Se ajustează pH-ul la 6 cu KOH. Lukens (1960) a folosit acest mediu, împreună cu hîrtia de filtru, pentru a stimula formarea de conidii, de vîrste și forme uniforme, la *Helminthosporium vagans* și *Alternaria solani.*

112. Lutz (modificat) (Singer, 1962)

Extract de malț „Vitrums"	10 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
NH_4NO_3	1 g	$Fe_2(SO_4)_3$	0,1 g
$(NH_4)_2HPO_4$	1 g	$MnSO_4$	0,025 g
Agar	25 g	Apă	1 000 ml

Folosit pentru creștere și diagnosticare la aproape toate specile care nu formează micorize și la multe specii micorizice de *Agaricaceae* și *Boletaceae.*

113. Machlis (1953), I

Clorhidrat de aneurină	0,15 mg/l	B (ca H_3BO_3)	0,5 ppm
D, L-Metionină	0,1 g/l	Cu (ca $CuSO_4$)	0,1 ppm
$MgCl_2$	0,001 M	Fe (ca $FeCl_3$)	0,5 ppm
KH_2PO_4	0,01 M	Mo (ca $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)	0,2 ppm
$(NH_4)_2HPO_4$	0,005 M	Co (ca $CoCl_3$)	0,2 ppm
$CaCl_2$	0,0002 M	Glucoză	5 g/l
Mn (ca $MnCl_2$)	0,5 ppm	Apă	1 000 ml
Zn (ca $ZnSO_4$)	0,5 ppm		

Este o modificare a mediului lui Ingraham. Se ajustează pH-ul la 7 cu KOH. Glucoza ca și soluțiile de $CaCl_2$ și $MgCl_2$ se sterilizează separat, apoi se amestecă și se adaugă aseptic la restul mediului (Koch, 1968). Este folosit pentru cultivarea ciupercilor din clasa *Trichomycetes* și pentru studii de nutriție la *Allomyces.*

114. Machlis (1953), II

KH_2PO_4	0,0001 M
$MgCl_2$	0,0001 M
$CaCl_2$	0,00002 M

Soluție recomandată pentru stimularea diseminării sporilor la ciupercile acvatice. Se ajustează pH-ul la 7 cu KOH.

115. Maltoză (Blackburn & Hayes, 1963)

Maltoză	10 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	$NaNO_3$	2 g
KH_2PO_4	1 g	Apă distilată	1 000 ml
KCl	0,5 g		

Se ajustează pH-ul la 6,8. Pentru stimularea sporulării se poate adăuga 50 mg/l mezo-inozitol. Recomandat pentru cultivarea ciupercilor nematodofage din clasa *Hyphomycetes*.

116. Maltoză-tartrat de amoniu (Timnick, & al., 1952)

Maltoză	20 g	Zinc	0,2 mg
Tartrat de amoniu	2,8 g	Fier	0,2 mg
KH_2PO_4	1 g	Mangan	0,1 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Agar	20 g
Aneurină	50 μg	Apă distilată	1 000 ml

Recomandat pentru stimularea sporulării la *Melanconium fuligineum*, în culturi crescute la 25° și lumină intermitentă.

117. Maltoză-peptonă

	A	B
Maltoză	3 g	1,4 g
Peptonă	1 g	50 mg
Agar	—	13,5 g
Apă	1 000 ml	900 ml

A — Pentru producerea de zoospori la *Aphanomyces euteiches* (Lockwood & Ballard, 1959; Llanos & Lockwood, 1960).

B — Poate înlocui infuzia de fîn (Koch, 1968).

118. Malț (extract)-agar

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Extract malț	20—25 g	50 g	20 g	20 g	20 g	20 g	10 g	3 g	20 g
Extract drojdii	—	—	—	—	—	—	5 g	2 g	—
Peptonă	—	—	1 g	—	—	—	1,5 g	—	—
Dextroză	—	—	20 g	—	—	—	—	—	—
Sucroză	—	—	—	200 g	—	400 g	—	—	—
Maltoză	—	—	—	—	—	—	5 g	—	—
Acid malic	—	5 g	—	—	—	—	—	—	—
NaCl	—	—	—	—	100 g	—	—	—	75 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	—	—	—	—	—	—	0,5 g	0,5 g	—
KH_2PO_4	—	—	—	—	—	—	0,25 g	0,5 g	—
$Ca(NO_3)_2$	—	—	—	—	—	—	0,5 g	—	—
Agar	15—20 g	—	18—20 g	20 g	20 g	20 g	30 g	20 g	15 g
Apă	cîte 1 000 ml la toate formulele								

A — Rețeta standard. Se încălzește extractul de malț în apă pînă se dizolvă, se adaugă agarul și se fierbe pînă se topește. Valoarea pH-ului

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

este de 3—4 și se poate ajusta la 6,5 cu NaOH. Se sterilizează 20 minute la 121° (115° după Rapilly, 1968). Nu trebuie supraîncălzit deoarece agarul va fi hidrolizat. Hanusova (1964) recomandă îmbibarea unor cilindri de hîrtie de filtru cu acest mediu pentru obținerea de conidii la *Venturia inaequalis*.

B — Modificare a formulei standard, folosită pentru *Basidiomycetes*.

C — Formula Blakeslee (1915) recomandată pentru *Mucoraceae*. Se sterilizează 30 minute la 104° (Rapilly, 1968). După Raper & Fennell (1965) mediul este indicat pentru identificarea speciilor de *Penicillium* și *Aspergillus*, iar dextroza trebuie adăugată numai înaintea sterilizării finale, care se face la 121°, timp de 20 minute.

D, E — Pentru ciuperci care cer presiuni osmotice mari pentru sporulare ca cele din grupul *Aspergillus glaucus* (Dade, 1960).

F — Favorizează sporularea la *Eremascus albus* (Dade, 1960) și *Aspergillus*.

G — Indicat pentru creșterea majorității ciupercilor nemicorizice din familia *Agaricaceae* și *Boletaceae* (Singer, 1962).

H — Este o variantă a mediului Leonian, propusă de același autor (Leonian, 1934).

I — Mediu cu mare presiune osmotică folosit pentru izolarea mucegaiurilor care cresc pe produse depozitate la temperaturi relativ scăzute. Se folosesc concentrații de NCl de 7,5—20%. La sterilizare nu trebuie depășit timpul de 15 minute la 121° (Kotheimer & Christensen, 1961). După E. Yuill (Smith, 1971) este indicat pentru speciile din grupele *Aspergillus glaucus* și *A. restrictus*.

J — Pentru identificarea speciilor de *Penicillium* este indicat un mediu care conține 4% extract de malț și 2% agar, dizolvate în soluția Czapek (Anonim, 1968).

K — Nobles (1965) propune un mediu standard pentru identificarea ciupercilor din clasa *Hymenomycetes*, compus din 12,5 g mediu malț-agar „Difco", 20 g Bacto-agar „Difco" și 1 000 ml apă distilată.

119. Malț (extract)-arginină-acid nicotinic (Rusan, 1973)

Extract malț	10 g	Arginină	1 g	Se sterilizează 20 minute la 120°. Folosit pentru cultivarea lui *Trichothecium roseum*, în cercetări privind biosintetizarea trichothecinei.
Extract drojdii	5 g	Acid nicotinic	0,4 mg	
Fructoză	20 g	Apă distilată	1 000 ml	

120. Malț (extract)-morcov (Booth, 1971a)

Morcov	250 g	Se fierb morcovii în apă pînă devin moi, se filtrează prin muselină sau se trec prin sită. Se dizolvă agarul, apoi se adaugă extractul de malț și se sterilizează 20 minute la 121°. Recomandat pentru creșterea levurilor.
Extract malț	5 g	
Agar	25 g	
Apă	1 000 ml	

121. Manită-agar (Johansen, 1940)

Manită	15 g	$CaSO_4$	0,1 g	Denumit și mediul „Johansen" este folosit pentru cultivarea *Myxomycetelor*.
KH_2PO_4	0,2 g	Agar	15 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g	Apă distilată	1 000 ml	
NaCl	0,2 g			

122. Martin

	A	B	C	D	E	F
Peptonă	5	15	5	0,5	5	5
Extract drojdii	—	—	0,5	0,5	—	—
Dextroză	10	—	10	10	10	10
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K_2HPO_4	—	1	0,5	0,5	—	—
KH_2PO_4	1	—	0,5	0,5	1	1
Roz bengal	0,033	0,033	0,05	0,05	0,033	0,033
Taurocolat de Na (sol. 10%)	—	10 picături	—	—	—	—
Streptomicină (sulfat)	0,03	—	0,03	0,03	0,03	0,03
Bilă de bou	—	—	—	—	5	—
Propionat de Na	—	—	—	—	1	—
Terraclor (PCNB)	—	—	—	—	—	0,1—0,5
Pimaricină	—	—	—	—	—	0,01—0,02
Agar	20	25	18	17	20	20
Apă	cîte 1 000 ml la toate formulele					

g

Medii tipice pentru izolarea ciupercilor din sol sau aer și pentru înlăturarea bacteriilor din culturile de ciuperci. Nu trebuie expuse la lumină deoarece roz bengalul devine fungistatic. Se sterilizează în flacoane de 1 000 ml și antibioticele se introduc după sterilizare, cînd mediul s-a răcit la circa 45°.

A — Formula standard a lui Martin (1950).

B — Modificat de Snyder & al. (1959).

C — Propus de Tsao (1964). Împreună cu D sînt indicate pentru izolarea lui *Thielaviopsis basicola.*

E — Propus de Papavizas & Davey (1959), favorizează izolarea ciupercilor din sol.

F — Modificare adusă de Singh & Mitchell (1961).

123. Măr (decoct de frunze)-agar

	A	B		A	B
Frunze de măr	25 g	10 g	Agar	17 g	20 g
Extract malț	5 g	15 g	Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

Frunzele colectate toamna sau iarna se usucă, se fierb timp de 30 minute în 500 ml apă distilată. Se completează cu apă la 1 litru și se dizolvă extractul de malț și agarul. Se sterilizează 20 minute la 121°.

A — Recomandat pentru producerea de peritecii la *Venturia inaequalis* (Keitt & Langford, 1941).

B — Folosit de Rusan (1973) pentru creșterea lui *Trichothecium roseum.*

C — Boone & Keitt (1956) propun înlocuirea mediului A pentru producerea de peritecii la *Venturia inaequalis* cu următorul: la decoctul din frunze de măr se adaugă 5 g dextroză, 40 g cartofi și 17 g agar. Ciuperca se crește la 16—20°, timp de 10—14 zile și se păstrează apoi la 8°, timp de 3—4 luni pînă se maturează periteciile.

124. Mazăre-agar

	A	B	C
Mazăre uscată	100 g	400 g	150 g
Agar	25 g	20 g	—
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

Mazărea se fierbe timp de o oră, se strecoară și lichidul se completează la un litru.

Se adaugă agarul, se topește și se sterilizează.

A — Descris de Gwynne-Vaughan & Barnes (1927).

B — Recomandat de Riker & Riker (1936).

C — Folosit pentru producerea de sporangi la *Phytophthora ilicis* (Buddenhagen & Young, 1957).

125. Mazăre (semințe) (Thurston, 1957)

Mazăre galbenă, uscată, se înmoaie timp de 10—12 ore și apoi se pune un strat de 2,5 cm în flacoane de 250 ml, se adaugă apă pentru a acoperi mazărea și se sterilizează. Indicat pentru producerea de sporangi la *Phythopthora infestans*, după o incubare de 7—10 zile la 20°. Incubația în condiții de temperatură și iluminare fluctuantă favorizează sporularea la *Phoma lingam* și *Kabatiella lini* (Cruickshank, 1953).

126. Mazăre (bulion) (Leonian, 1934)

Conținutul de la o conservă de 500 g se spală bine și se adaugă apă distilată pînă la 4 litri. Se încălzește pînă la fierbere se lasă să se depună, se sifonează și se filtrează prin bumbac absorbant.

127. McIntosh, modificat (Sneth, 1972)

KH_2PO_4	1 g	Clorhidrat de aneurină	0,02 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Ulei de porumb	10 ml
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g	Cloramfenicol	60 ppm
DL-treonină	1 g	Polimixină	60 ppm
Sucroză	5 g	Penicilină	60 ppm
		Agar	20 g
		Apă distilată	1 000 ml

Folosit pentru izolarea și identificarea speciilor de *Phytophthora* din sol. După McIntosh & Sneth (1972), prin adăugarea de 20 ppm benomil sau 80 ppm pimaricin se inhibă dezvoltarea altor ciuperci.

128. Microelemente (soluție)

	A	B
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	723,5 mg	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	439,8 mg	0,1 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	203,0 mg	0,1 g

A — Formula lui Lilly & Barnett (1951). Se dizolvă pe rînd într-un litru de apă. Se adaugă acid sulfuric pentru a obține o soluție clară. Se folosesc cîte 2 ml/l mediu, ceea ce reprezintă 0,2 mg de Fe și Zn și 0,1 mg de Mn.

B — Formula lui Shirling & Gottlieb (1966). Se dizolvă în 100 ml apă distilată și se folosește de obicei cîte 1 ml soluție la 1 l de mediu.

129. **Miere-peptonă-agar** (Backus & Stauffer, 1955; Greslags & Swift, 1957)

Miere	60 g
Peptonă „Difco"	10 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Se obține un pH favorabil pentru creșterea ciupercilor și inhibitor pentru majoritatea bacteriilor. Agarul este adăugat în apă, înaintea celorlalte ingrediente, pentru a preveni caramelizarea zahărului.

130. **Minerale (soluție săruri)** (Wills, 1954)

KCl	50 mg	K_2CO_3	300 mg
KH_2PO_4	100 mg	Apă distilată	1 000 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50 mg		

pH-ul trebuie să fie alcalin pentru a induce formarea sporangilor la *Phytophthora*. După creșterea pe cartof-dextroză (care conține 30 g dextroză) se transferă pe mediul de săruri minerale.

131. **Minerale (săruri)-agar** (Berk & al., 1957)

KH_2PO_4	0,7 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,002 g
K_2HPO_4	0,7 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,002 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,7 g	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001 g
NH_4NO_3	1 g	Agar „Difco"	15 g
NaCl	0,005 g	Apă distilată	1 000 ml

Soluția are pH = 6,4 și se sterilizează 20 minute la 116°.

132. **Molibden** (MacLaren, 1961)

Peptonă „Difco"	10 g
Sucroză	40 g
Agar	15 g
Apă distilată	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 7,6 și se sterilizează 15 minute la 116°. Se răcește la 50—55°, se adaugă 15 ml soluție apoasă 12,5% de acid fosfomolibdic „Merck" (concentrația finală 1,9 mg/ml). Folosit pentru izolarea primară și identificarea lui *Candida albicans, C. tropicalis* și *Torulopsis glabrata*. (Bump & Kunz, 1968).

133. **Morcov-agar**

	A	B	C
Morcovi	300 g	20 g	300 g
Agar	30 g	20 g	12 g
Apă distilată	1 500 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Se fierb morcovii la foc mic, în 500 ml apă, pînă se înmoaie, se macerează și se sterilizează la 121°, timp de 30 minute. Se adaugă 1 000 ml apă și agarul și se dizolvă. Se sterilizează din nou la 121° timp de 15 minute (Smith, 1960).

B — Se înmoaie morcovii rași, timp de o oră în apă, apoi se fierb 5 minute și se filtrează prin vată (Langeron & Vanbreuseghem, 1952).

C — Se folosesc frunze care se taie mărunt și se fierb pe baie o oră, în 500 ml apă. Se strecoară și se adaugă agarul topit în 500 ml apă. Stimulează sporularea la speciile de *Cercospora* (Kilpatrick & Johnson, 1956). Rezultate similare au obținut Raicu & Coicev, (1967) folosind mediul „urzici (frunze)-agar", preparat în același mod, din 150 g frunze de urzici *(Urtica dioica)*.

D — Pentru stimularea reproducerii sexuate la *Pythium*, Johann (1928) pune într-o eprubetă morcovi raşi, pînă la înălţimea de 2,5 cm şi deasupra 10 ml de apă-agar 1,7%.

134. **Moyer** (Raper & Fennell, 1965)

Soluţia I. 200 g cartofi spălaţi şi tăiaţi, se pun în 500 ml apă distilată şi se fierb în autoclav, 20 minute la 121°. Se filtrează şi se completează la un litru.

Soluţia a II-a.

Macerat de porumb	5 ml
Peptonă	1 g
Glucoză	20 g
* Soluţie săruri	10 ml
Tartrat de Fe (sol. 5 mg/l)	2 ml
Zn (sol. 22 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$/ml)	0,5 ml
Apă	500 ml

* *Soluţie săruri în apă distilată :*

$MgSO_4$	0,25 g/l
KH_2PO_4	0,30 g/l
NH_4NO_3	2,25 g/l

Se amestecă sol. I cu II, se adaugă agar 20 g/l şi $CaCO_3$, 4 g/l. Se sterilizează 20 minute la 120°. Mediu util pentru identificarea speciilor de *Aspergillus* din seria *janus* şi grupurile *flavipes* şi *sparsus*.

135. **Mucor** (Hesselline, 1954)

Dextroză	40 g	Clorură de aneurină	0,005 g
Asparagină	2 g	Agar	15 g
KH_2PO_4	0,5 g	Apă distilată	1 000 ml
$MgSO_4$	0,25 g		

Recomandat pentru culturi în vederea identificării speciilor de *Mucor*.

136. **Napi (seminţe)-agar** (Satour, 1967)

Seminţe napi	100 g
Agar	20 g
Apă distilată	1 000 ml

Se spală bine seminţele de napi (*Brassica napus* L.) şi se fierb într-un litru de apă distilată, timp de 30 minute. Se filtrează extractul prin vată şi se completează la un litru. Se adaugă agarul şi se sterilizează 15 minute la 121°. Se ajustează pH-ul la 7. Recomandat pentru producerea de oospori la *Phytophthora*.

137. **Năut-agar** (Keay, 1953)

Seminţe de năut (*Cicer arietinum*)	250 g
Sucroză	20 g
Agar	15 g
Apă distilată	1 000 ml

Se spală seminţele în apă de robinet, timp de o oră şi se pun la înmuiat în apă distilată, timp de 10—12 ore. Se scurge apa şi se mojarează seminţele. Se adaugă un litru de apă, se fierbe o oră şi se strecoară prin pînză. Sucroza şi agarul se dizolvă separat. Se distribuie în eprubete şi se sterilizează la 116° timp de 15 minute. Năutul se poate înlocui cu mazăre (*Pisum sativum*). După Rapilly (1968) în loc de seminţe se pot folosi 70 g făină de năut.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

138. Neopeptonă-glucoză-agar

	A	B
Neopeptonă	2 g	5 g
Glucoză	2,8 g	—
Dextroză	—	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,25 g	—
KH_2PO_4	2,72 g	—
Agar	20 g	20 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

A — Pentru sporulare la *Colletotrichum lindemuthianum* (Mathur & al., 1960).

B — Denumit şi „American Sabouraud Agar" este mai uşor de preparat, tot atît de bun ca mediul cartof-dextroză-agar şi indicat pentru conservarea culturilor (Cooke, 1963).

139. Neopeptonă-roz bengal-aureomicină-agar (Cooke, 1963)

Neopeptonă „Difco" sau Polipeptonă „BBL"	5 g
Dextroză	10 g
Roz bengal	0,035 g
Aureomicină HCl	35 µg/ml
Agar	20 g
Apă distilată	1 000 ml

Soluţia de roz bengal poate fi preparată înainte şi păstrată în frigider. Un gram de roz bengal se adaugă la 100 ml apă şi 3,5 ml din această soluţie se pune la un litru de mediu, înainte de sterilizare.
Aureomicina (1 g la 150 ml apă) trebuie sterilizată prin filtrare, păstrată în frigider şi adăugată înainte de turnarea mediului, cîte 5 ml la litru sau 0,5 ml la 100 ml mediu. Recomandat pentru izolarea primară a ciupercilor din ape reziduale sau poluate.

140. Neurospora (mediu „complet") (Beadle & Tatum, 1945)

Glucoză	5 g
Sucroză	5 g
Hidrolizat de cazeină	5 ml
Extract drojdii „Difco"	2,5 g
Sirop de malţ	5 g
Soluţie de vitamine	10 ml
Agar	15 g
Apă	1 000 ml

Soluţia de vitamine :	mg/l
Aneurină	100
Riboflavină	50
Piridoxină	50
Acid pantotenic	200
Acid para-aminobenzoic	50
Nicotinamidă	200
Colină	200
Inozitol	400
Acizi nucleici din levuri, hidrolizaţi alcalin	500
Acid folic	4 µg

141. Neurospora (mediu „minimal")

	A	B
Tartrat de amoniu	5 g	—
NH_4NO_3	1 g	—
KNO_3	—	1 g
KH_2PO_4	1 g	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	0,5 g
NaCl	0,1 g	0,1 g
$CaCl_2$	0,1 g	0,1 g
Sucroză	15 g	20 g
Biotină	5 µg	5 µg
Soluţie microelemente	1 ml	1 ml
Agar	—	15 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

Soluţie microelemente :	mg/l
B	0,01
Cu	0,1
Fe	0,2
Mn	0,02
Mo	0,02
Zn	2

A — Formula lui Beadle & Tatum (1945). Valoarea pH-ului va fi 5,6. Pentru evitarea creşterii miceliului superficial, aerian, se va reduce sucroza la 1 g şi se va adăuga 0,8 g l-sorboză (Tatum & al., 1949).
B — Formula lui Westergaard & Mitchell (1947). Înainte de sterilizare se ajustează pH-ul la 6,5. Favorizează reproducerea sexuată.

142. **Nisip-pămînt-rădăcini tomate** (Hornby, 1964)

Nisip de cuarţ (cernut prin sită de 2 mm)	1 parte
Pămînt de grădină (cernut prin sită de 2 mm)	1 parte
Rădăcini de tomate (de la plante mature) tocate fin	1 parte

Se sterilizează în loturi de 270 g timp de 45 minute la 121°. Se păstrează două zile la 25° şi apoi se umidifică la 80% din capacitatea de reţinere a apei şi se sterilizează 45 minute la 121°. Folosit pentru producerea de scleroţi la *Colletotrichum coccodes*.

143. **Nutramigen-agar** (Fergus, 1954)

* Nutramigen	16 g
Agar	17 g
Apă distilată	1 000 ml

* Aliment pentru copii, produs de Mead Johnson & Co., Evansville, Indiana.

Pentru producerea de conidii la *Ceratocystis fagacearum*.

144. **Ohio (OAES)** (Williams & Schmitthenner, 1956)

Glucoză	5 g	Cloramfenicol	50 mg
Extract drojdii	2 g	Bilă de bou	1 g
$NaNO_3$	1 g	Propionat de Na	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Agar	20 g
KH_2PO_4	1 g	Apă distilată	1 000 ml
Streptomicină (sulfat)	50 mg		

Se sterilizează 15 minute la 117°. Folosit pentru izolarea primară a ciupercilor din sol, apă etc.

145. **Ou (gălbenuş)-cartof** (Sasano & Medlar, 1943)

I. *Mediul de cartofi:*

Cartofi (curăţaţi şi mărunţiţi)	200 g
Glicerină	60 ml
Acid citric	0,2 g
Hemoglobină-Bacto	5 g
Apă	1 000 ml

Se sterilizează 30 minute la 121°, se filtrează prin două straturi de muselină, se repartizează cîte 500 ml în flacoane şi se sterilizează din nou 30 minute la 121°.

II. *Filtratul de gălbenuş de ou:* se spală ouăle, se imersează în alcool 80% timp de 2 ore. Se scot din alcool şi se flambează. Se separă albuşul de gălbenuş într-un vas steril. Se amestecă un ou întreg cu 11 gălbenuşuri şi se filtrează prin două straturi de muselină, sterilă.

III. *Preparare:* se amestecă 500 ml din filtrat cu 500 ml mediu de cartof. Se adaugă 10 ml roşu de Congo, steril, se distribuie în eprubete sau vase Petri şi se evaporă prin fierbere, timp de o oră, în autoclav fără presiune. Eprubetele sau vasele Petri trebuie păstrate bine închise cu parafină pentru a evita evaporarea (Titsworth & Grunberg, 1950).

146. **Ovăz (făină)-agar**

	A	B	C
Făină ovăz	30 g	60 g	50 g
NaCl	—	—	5 g
Agar	20 g	12 g	20 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Se amestecă făina (pudră) cu apa, se încălzește treptat pe baie de apă pînă la fierbere și se fierbe o oră, agitînd din cînd în cînd. Se strecoară prin muselină, se completează cu apă la 1 000 ml, se adaugă agarul și se fierbe pînă se dizolvă. Se sterilizează 20 minute la 121°. Riker & Riker (1936) recomandă folosirea a 100 g făină. După Anonim (1968) se poate adăuga 0,5 ml ulei din embrioni de grîu, iar pentru ciupercile sensibile este indicată folosirea agarului japonez „Kobe". Mediu excelent pentru unele ciuperci, în special *„Phycomycetes"* și multe specii din *Deuteromycotina* (Altman, 1966) și *Fusarium* (Booth, 1971 *b*).
B — Se folosește ovăz sfărîmat și nu măcinat fin. Se amestecă ovăzul cu 600 ml apă, timp de 5 minute, se adaugă agarul topit și se pune în flacoane. Se sterilizează 30 minute la 121° (Gooding & Lucas, 1959).
C — Rețeta lui Rapilly (1968). Se înmoaie făina, se adaugă NaCl, se fierbe 20 minute, se filtrează și se adaugă agarul. Se sterilizează 20 minute la 120°.

147. **Ovăz (fulgi)-agar** (Alexopoulos & Beneke, 1968)

Se prepară o soluție apă-agar 1,5% într-un flacon. Se umple fiecare eprubetă pînă la 1,5 cm de la partea de jos cu fulgi de ovăz și se toarnă 10—15 ml apă-agar peste fulgi. Se pun dopuri și se sterilizează.

148. **Park** (1961)

Glucoză	0,7 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
KH_2PO_4	0,2 g
NH_4NO_3	0,1 g
Apă distilată	1 000 ml

pH-ul este 4 și mediul poate fi solidificat prin adăugarea de 15 g agar (Oxoid Nr. 3). Indicat pentru sporulare la *Fusarium oxysporum*.

149. **Pasteur (soluția modificată)** (Booth, 1971a)

KH_2PO_4	1 g	Tartrat de amoniu	5 g
$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	0,1 g	Glucoză	75 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g	Apă distilată	1 000 ml

150. **Pentaclornitrobenzen (PCNB)**

	A	B	C
Peptonă „Difco"	15 g	15 g	—
KH_2PO_4	1 g	1 g	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	0.5 g	—
PCNB	1 g	0.5 g	1 g
Bilă de bou	—	0,5 g	—
Piersici	—	—	20 g
Streptomicină (sulfat)	0,3 g	0,1 g	0.5 g
Clortetraciclină, HCl	—	0,05 g	—
Neomicină	—	—	0,1 g
Agar	20 g	20 g	20 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Recomandat de Nash & Snyder (1962) și Booth (1971 *b*) pentru izolarea lui *Fusarium* din sol. Dacă se folosește proaspăt nu trebuie sterilizat (Tuite, 1969).

B — Variantă a mediului *A* propusă de Papavizas (1967). Dacă se folosește proaspăt nu trebuie sterilizat.

C — Se folosesc piersici din conserve, strecurate. Permite creșterea rapidă a lui *Monilinia fructicola* și *M. laxa* și represează *Mucoralele* și alte ciuperci sau bacterii contaminante (Phillips, 1971).

151. **Perrot** (1960)

$NaNO_3$	2 g	Peptonă	5 g
KCl	0,5 g	Făină de porumb-agar (corn meal-agar „Difco")	20 g
K_2HPO_4	0,5 g	Apă distilată	500 ml
$MgSO_4$	0,5 g	Apă de lac	500 ml
$Fe_2(SO_4)_3$	0,01 g		
Sucroză	15 g		

Multe specii de *Monoblepharis* cresc bine și produc sporangi pe acest mediu (Jones, 1971).

152. **Pește (bulion)** (Booth, 1971a)

Metoda 1

Bulion de pește	500 ml
Făină de grîu	400 g
NaCl	50 g

Bulionul reprezintă apa în care a fost fiert peștele. Deoarece făina din comerț conține de obicei fungicide se recomandă măcinarea boabelor de grîu, curate. Acest mediu reprezintă o modificare a rețetei lui Höye pentru cultivarea lui *Sporendonema sebi*.

Metoda 2

Cod proaspăt	1 kg
Peptonă	5 g
NaCl	200 g
Făină de grîu	400—500 g
Apă	1 000 ml

Se macerează peștele și se menține în apă 4 ore. Se strecoară prin muselină, se adaugă peptona și sarea și se sterilizează 20 minute la 121°. Se adaugă făina și dacă este necesar se filtrează din nou prin muselină. Se sterilizează 35 minute la 110°.

153. **Petri (soluție minerală)**

$Ca(NO_3)_2$	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,15 g
KH_2PO_4	0,15 g
KCl	0,06 g
Apă distilată	1 000 ml

Soluția se păstrează la frigider și se folosește nesterilă, pentru a obține dezvoltarea sporangilor de *Phytophthora* din plante atacate (Holliday & Mowat, 1963; Booth, 1971 *a*). Pentru obținerea sporangilor se imersează parțial, în soluție, fragmente mici de agar, țesut din planta gazdă sau semințe care conțin miceliu. După 3—4 zile se înlocuiește soluția cu apă distilată (Tuite, 1969).

154. **Piine** (Blochwitz, 1930)

Se taie bucăți de pîine în formă de prisme de 5 cm lungime și 1 cm lățime. Se introduc în eprubete și se adaugă apă. Pentru sterilizare se încălzește treptat pentru a evita fărîmițarea miezului. Variind cantitatea de apă se obține sporularea speciilor higrofile, mezofile, xerofile, în special la *Aspergillus, Penicillium* și *Mucor*.

BOTANICAL UNIVERSITY LIBRARY

155. **Pîine-agar** (Berliner, 1962)

Miez de pîine	100 g
Agar-Bacto	18 g
Apă distilată	1 000 ml

Este foarte util pentru demonstrarea luminiscenței la culturile dicariotice de ciuperci (*Panus stipticus, Armillariella mellea, Mycena polygramma* ș.a.). După 14—21 zile, culturile de micelii dicariotice păstrate la 22°, în întuneric, manifestă cea mai intensă luminiscență.

156. **Plante (fragmente)**

A — Din cartofi, morcovi, napi, sfeclă etc. se obțin cilindri de 4—5 cm lungime și de lățime potrivită pentru a putea fi introduși în eprubete. Se secționează cilindrul în diagonală și fiecare fragment obținut se introduce într-o eprubetă în care s-a pus, în partea de jos, vată umectată cu 2 ml apă. Se sterilizează 20 minute (10 după Booth, 1971 *a*) la 127° (120° după Langeron & Vanbreuseghem, 1952). Smith (1971) consideră că este necesară sterilizarea două zile consecutiv. În același mod se pot utiliza păstăi tinere de mazăre, fasole, peţioli sau nervuri de la frunzele de sfeclă sau varză, tulpini de soia, fasole, mazăre, tomate, *Melilotus* sau *Lupinus polyphyllus* (Riker & Riker, 1936).

B — Rapilly (1968) recomandă folosirea tuburilor Roux. Se pune în partea de jos apă distilată, se introduc fragmentele de plante și se sterilizează 30 minute la 115°. Se utilizează pentru izolarea sau stimularea sporulării la diferite ciuperci. *Coniothyrium fuckelii* sporulează pe tulpini de trandafiri iar *Cercospora beticola* pe fragmente de tulpini de sfeclă, impregnate cu mediul malţ-agar.

C — În loc de apă, fragmentele de plante se pot introduce în mediul apă-agar. Booth (1971 *b*) recomandă folosirea paielor de grîu, de orez sau tulpini de diferite plante, în scopul producerii stadiului peritecial la speciile de *Fusarium.*

În locul sterilizării în autoclav, Snyder & Hansen (1947), recomandă sterilizarea fragmentelor de vegetale cu oxid de etilen sau oxid de propilen și apoi introducerea în mediul apă-agar topit, sterilizat. Folosind tulpini de mazăre acești autori au obținut fructificații la *Ascochyta pinodes, A. pinodella, Verticillium, Phytophthora, Pythium, Rhizoctonia, Alternaria solani* etc. Zentmyer & al. (1950) consideră că, pentru sporularea ciupercilor, sterilizarea vegetalelor cu oxid de propilen este mult mai potrivită decît cea prin căldură.

157. **Pontecorvo** (1953)

$NaNO_3$	6 g
KCl	0,52 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,52 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
KH_2PO_4	3,8 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
Glucoză	10 g
Apă	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 6,5 cu NaOH înainte de sterilizarea timp de 10 minute la 116°. Pentru producerea de peritecii la *Aspergillus nidulans* se reduce $NaNO_3$ la 1 g și se mărește cantitatea de glucoză la 20 g.

158 **Portocale** (Booth, 1971 a)

Glucoză	50 g
Citrat de amoniu	1,9 g
KH_2PO_4	1 g
KCl	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
Extract dintr-o portocală	
Apă pînă la	1 000 ml

pH-ul va fi de aproximativ 6,7 și trebuie ajustat la 4,5, prin adăugarea de HCl, înainte de completarea volumului final. Extractul de portocale : pentru un litru de mediu se macerează o portocală mare în 250 ml apă. Se completează la 500 ml și se fierbe 10 minute agitînd continuu. Se strecoară prin muselină, se amestecă pulpa cu alți 250 ml apă și se strecoară din nou.

Extractul poate fi limpezit parțial prin filtrare, dacă este necesar. Folosit pentru cultivarea lui *Penicilliopsis*.

159. **Porumb (făină și boabe)**

	A	B	C	D	E
Făină de porumb	20—40 g	200 g	—	20 g	—
Boabe de porumb	—	—	200 g	—	—
Dextroză	—	—	—	20 g	—
Peptonă	—	—	—	10 g	—
Extract drojdii	—	—	—	4 g	—
Albuș de ou	—	—	4—5 ouă	—	—
Pimaricină (sare de sodiu)	—	—	—	—	100 ppm
Penicilină (sare de sodiu)	—	—	—	—	50 ppm
Polimixină B (sulfat)	—	—	—	—	50 ppm
Mediu făină de porumb-agar (corn meal agar „Difco“)	—	—	—	—	1 000 ml
Agar	15—20 g	—	45 g	20 g	—
Apă	1 000 ml	1 000 ml	2 250 ml	1 000 ml	—

A — Se pune făina și apa într-o oală, se încălzește pe o baie de apă la fierbere și se amestecă timp de o oră. Se strecoară printr-o pînză de muselină sau hîrtie de filtru obișnuită, folosind filtrul Büchner, sau se decantează. Se adaugă agarul și se fierbe pînă se dizolvă. Se filtrează prin două straturi de vată (fixate între pînze) și se sterilizează 15—20 minute la 121°. Smith (1971), recomandă folosirea a 60 g făină și sterilizarea 30 minute la 116°. Se mai poate adăuga 20 g peptonă și 20 g dextroză dar, după Langeron & Vanbreuseghem (1952), peptona nu este necesară deoarece făina conține circa 10% protide. Pentru cultivarea speciilor de *Pythium* și *Phytophthora* sau alte ciuperci sensibile se poate adăuga 0,5 ml ulei din germeni de grîu, se va folosi apă distilată și agar japonez „Kobe“ (Anonim, 1968). Cooke (1963) recomandă acest mediu pentru cultivarea ciupercilor acvatice.

B — Variantă recomandată de Dickson (Altman, 1966). Se sterilizează 30 minute și este excelent pentru *Sclerotinia* și alte ciuperci care produc scleroți.

C — Se înmoaie 200 g boabe de porumb în 2 250 ml apă timp de 12 ore. Se fierbe o oră, se strecoară, se adaugă agarul și se dizolvă. Se răcește la 55° și se adaugă albușul bătut de la 4 sau 5 ouă. Se sterilizează o oră la 108° și se filtrează la cald, prin hîrtie de filtru umedă. Se distribuie în eprubete și se sterilizează 20 minute la 121°. Este recomandat

pentru izolări monosporale (Anonim, 1968). După Dade (1960) nu are merite speciale față de alte medii.

D — Modificare propusă de Benjamin (1958). Se fierbe făina în 700 ml apă la flacără și se strecoară prin pînză. Se dizolvă peptona în 300 ml apă la 60°. Se adaugă dextroza, extractul de drojdii și agarul. Se amestecă totul, se fierbe pe baie pînă la dizolvarea agarului și se sterilizează 20 minute la 121°.

E — Antibioticele se păstrează în soluții, în apă sterilă, la întuneric și se adaugă după sterilizare, deși numai penicilina este termolabilă. Este recomandat pentru izolarea lui *Phytophthora* și *Pythium* din sol (Eckert & Tsao, 1962).

160. **Porumb** (tulpini)

Se taie bucăți subțiri de tulpini de aproximativ 10 cm lungime și se pun cîte una în fiecare eprubetă. Se adaugă 1—2 ml apă distilată sau o soluție de săruri și se sterilizează. Multe ciuperci care nu fructifică pe mediile cu agar fructifică ușor pe acest mediu (Alexopoulos & Beneke, 1968).

161. **Prune-agar**

	A	B	C
Prune	—	30 g	—
Prune uscate	40 g	—	—
Extract de prune	—	—	5 g
Lactoză	—	—	5 g
Sucroză	—	40 g	—
Extract drojdii	—	—	1 g
Agar	20 g	30 g	30 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml

A — Se fierb prunele în 500 ml apă timp de o oră. Se topește în același timp agarul în 500 ml apă. Se strecoară sucul de prune în soluția de agar, se completează la 1 litru și se sterilizează (Riker & Riker, 1936; Alexopoulos & Beneke, 1968).

B — Se pun prunele în apă, se strecoară prin sită lichidul și cît mai multă pulpă, se adaugă agarul și se fierbe pînă la dizolvare. Se oprește fierberea, se adaugă sucroza și se amestecă pînă se dizolvă. Se ajustează *p*H-ul și se sterilizează 20 minute la 127° (Booth, 1971 a). După Dade (1960) nu are calități deosebite.

C — Extractul de prune trebuie să aibă *p*H-ul 5,8—6. Pentru a împiedica creșterea bacteriilor pe plăcile de izolare se poate adăuga la mediu 5 g tiocianat de potasiu. *Verticillium* produce un pigment caracteristic pe acest mediu (Anonim, 1968).

După Tuite (1969) mediul a fost descris de Talboy (1960) și extractul se prepară în felul următor: se încălzesc 50 g pulpă de prune strivite într-un litru de apă pînă devin moi. Se strecoară prin muselină, se filtrează și se completează la un litru. Poate fi conservat steril, în frigider, pînă la folosire cînd se adaugă cîte 100 ml la fiecare litru de mediu. Este folosit pentru identificarea lui *Verticillium albo-atrum* și *V. dahliae*.

162. Raper (1940)

Amidon solubil	3 g
Peptonă „Difco"	1 g
Extract de linte	10 g
Agar	20 g
Soluție săruri	1 000 ml

Soluția de săruri la 1 000 ml apă distilată :

KH_2PO_4	4,5 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3 mg
$CaCl_2$	1 mg
$FeCl_3$	160 µg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	30 µg

Extractul de linte *(Lens culinaris)* se prepară în apă fierbinte iar soluția de săruri în apă distilată în recipiente de sticlă. Este folosit pentru studiul sexualității la *Achlya ambisexualis.*

163. Raulin (soluția) (Raulin, 1869)

	A	B
Zahăr din trestie	70 g	—
Sucroză	—	50 g
Acid tartric	4 g	0,4 g
NH_4NO_3	4 g	0,25 g
K_2CO_3	0,6 g	0,4 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,6 g	0,4 g
$MgCO_3$	0,4 g	0,25 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,25 g	0,2 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,07 g	0,05 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,07 g	0,05 g
Silicat de potasiu	0,07 g	—
Agar	—	20 g
Apă distilată	1 500 ml	1 000 ml

A — Soluția tipică preparată pe baza analizei cenușii obținute de la *Aspergillus niger*. După Smith (1971), silicatul de potasiu care se dizolvă greu, poate fi omis. Langeron & Vanbreuseghem (1952) o recomandă pentru purificarea de bacterii, în special a culturilor de ciuperci levuriforme.

Soluția Raulin-Thom se deosebește doar prin înlocuirea NH_4NO_3 cu tartrat de amoniu, ceea ce, după Smith (1971), care descrie amănunțit metoda, îl face mai greu de preparat.

B — Modificare a lui Mosseray (1934)

164. Raulin-Dierckx, soluție neutră

Soluția 1 : se triturează într-un mojar 0,4 g $MgCO_3$ cu 0,71 g acid tartric și cîteva picături de apă, apoi se toarnă repede în 100 ml apă distilată.

Soluția a 2-a : în 800—900 ml apă distilată se dizolvă :

Zaharoză sau sucroză	46,6 g	$(NH_4)_2SO_4$	0,16 g
NH_4NO_3	2,66 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,04 g
$(NH_4)_2HPO_4$	0,4 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,04 g
K_2CO_3	0,4 g		

Se adaugă 66,7 ml din soluția 1 în soluția 2 și se completează la un litru cu apă distilată. Se sterilizează 20 minute la 120°.

După Raper & Fennell (1965) poate fi solidificat cu 100 g gelatină.

BOTANICAL GARDEN UNIVERSITY LIBRARY

După Smith (1971) stimulează producerea de pigmenți la multe specii de *Penicillium* și provoacă creșteri tipice la speciile coremiforme ale genului.

165. Reischer

	A	B		A	B
Sucroză	—	0,41 g	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mg	—
L-asparagină	—	0,12 g	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	20 mg	—
EDTA	0,5 g	11,6 mg	H_3BO_3	20 mg	—
K_2HPO_4	0,3 g	30 mg	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1 mg	—
KH_2PO_4	0,3 g	30 mg	Clorhidrat de aneurină	—	0,04 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g	20 mg	Endomicină	—	5 mg
$CaCl_2$	10 mg	0,56 mg	Streptomicină (sulfat)	—	50 mg
$MnCl_2$	40 mg	2,88 mg	Agar	—	20 g
$ZnCl_2$	40 mg	1,67 mg	Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml
$FeCl_3$	1 mg	0,10 mg			

A — Formula standard (Reischer, 1951) este recomandată pentru creșterea *Saprolegniaceelor.*

B — Modificare propusă de Schmitthenner (1962) în scopul izolării speciilor de *Pythium* din sol.

166. Rhizoctonia-agar (Diehl, 1916)

Zaharoză	10 g	Agar	20 g
K_2HPO_4	1 g	Apă	1 000 ml

167. Richard

	A	B
KNO_3	10 g	10 g
KH_2PO_4	5 g	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,5 g	2,5 g
$FeCl_3$	0,02 g	0,02 g
Amidon din cartofi	—	10 g
Sucroză	50 g	50 g
Agar	—	20 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

A — Formula standard (Booth, 1971 a).

B — Modificare propusă de McLean & Cook (1941).

168. Richards (1951)

KH_2PO_4	1 g	Fe	0,2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Zn	0,2 g
Asparagină	2 g	Mn	0,2 g
Sucroză	20 g	Agar	20 g
		Apă distilată	1 000 ml

Recomandat pentru stimularea sporulării la *Septoria nodorum.*

169. Ridichi-agar (Ghafoor, 1964)

Ridichi (rădăcini)	200 g
Agar	20 g
Apă pînă la	1 000 ml

Se macerează ridichile în apă la 60° timp de o oră. Se adaugă agarul topit și se completează la un litru. Recomandat pentru conservarea și producerea de oospori la *Aphanomyces raphani.*

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

170. Robbins & Hervey (1959)

Se adaugă 8 ml extract de lemn sau tomate la fiecare 100 ml de mediu de bază.
Mediul de bază per litru de apă distilată :

KH_2PO_4	1,5 g	Piridoxină	0,205 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Acid nicotinic	0,123 mg
Dextroză	20 g	Acid paraaminobenzoic	0,137 mg
Hidrolizat de cazeină	2 g	Pantotenat de Ca	0,476 mg
Sulfat de adenină	8,09 mg	m-inozitol	216,19 mg
Citozină	2,22 mg	Acid folic	1 mg
Guanină HCl	4,11 mg	Biotină	0,01 mg
Hipoxantină	2,72 mg	Vitamina B_{12}	0,01 mg
Timină	0,25 mg	B	0,005 mg
Uracil	2,24 mg	Cu	0,02 mg
Xantină	0,06 mg	Fe	0,1 mg
Colină Cl	5,58 mg	Ga	0,01 mg
Acid uracilic	0,62 mg	Mn	0,01 mg
Clorhidrat de aneurină	0,337 mg	Mo	0,01 mg
Riboflavină	0,376 mg	Zn	0,09 mg

Se neutralizează cu $CaCO_3$.
Extractul de lemn: se sterilizează 500 g lemn uscat de fag (mărunţit într-o moară) cu 10 : 1 apă distilată. Se reduce filtratul pe o placă încălzită la 1 : 1 şi se filtrează prin celită.
Extractul de tomate: se filtrează extractul de tomate conservat, prin muselină şi celită.
Folosit pentru cultivarea *Basidiomycetelor.*

171. Roxon & Batra (1973)

Rockland rabbit ration *	25 g
Agar	15 g
Apă	1 000 ml

Mediul, denumit "Rabbit food agar" sau RFA, se pregăteşte prin fierberea, macerarea 30 minute şi filtrarea prin 4 straturi de tifon a preparatului alimentar, după care se amestecă cu agarul şi se sterilizează 15 minute. Este recomandat pentru cultura speciilor de *Anthracobia, Ascodesmis, Pyronema* şi *Trichophaea.*

* Aliment pentru iepuri produs de Tekbald Inc. Conţine grîu, lucernă, soia, orz şi fosfat de Ca.

172. Russell (1956)

Extract malţ, deshidratat „Oxoid"	30 g	Se sterilizează 10 minute la 116°. Se dizolvă 1 g de o-fenil fenol în 50 ml alcool industrial şi se completează cu apă la 100 ml.
Peptonă micologică „Oxoid"	5 g	
o-fenil fenol	0,06 g	
Agar	25 g	
Apă	1 000 ml	

Folosit pentru izolarea selectivă a *Basidiomycetelor.*

173. Sabouraud-glucoză-agar (S a b o u r a u d, 1910)

	A	B
Glucoză, maltoză sau dextroză	30—40 g	—
Peptonă	10 g	30 g
Agar	15—20 g	15—20 g
Apă distilată	1 000 ml	1 000 ml

Se amestecă ingredientele, se fierb pînă la dizolvare, se ajustează *p*H-ul la 5,6. Se sterilizează la 120° timp de 10 minute, (30 minute la 104° după Rapilly, 1968 sau 15 minute la 110° după Stockdale, 1971). Este un mediu clasic pentru cultura dermatofiților, foarte sensibil, care nu trebuie supraîncălzit la sterilizare.

Formula B este recomandată de Langeron & Vanbreuseghem (1952) pentru conservarea culturilor de dermatofiți. După Rapilly (1968) se poate folosi cu succes, în același scop, formula clasică dar cu reducerea la jumătate a cantităților de ingrediente.

După Merz & al. (1970) mediul Sabouraud este mai puțin potrivit decît alte medii pentru izolarea dermatofiților, cu excepția levurilor, deoarece pe el se dezvoltă puțini dermatofiți și mai multe bacterii și ciuperci contaminate. După Gustafsson (1965) este foarte indicat pentru creșterea speciilor de *Entomophthora.*

Gorman (1967) descrie mediul „Sabhi" care este o combinație dintre mediul Sabouraud cu „Brain-Heart-infusion-agar", la care se adaugă sînge și cloramfenicol, ceea ce mărește considerabil numărul ciupercilor patogene izolate.

Adăugarea extractului de drojdii, 0,3—0,5% este indicată pentru izolarea și cultivarea speciilor de dermatofiți care necesită vitamine (Stockdale, 1971).

174. **Sachs-agar**

$Ca(NO_3)_2$	1 g
K_2HPO_4	0,25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
$FeCl_3$	urme
$CaCO_3$	4 g
Agar	20 g
Apă	1 000 ml

Luttrell (1958) induce producerea de peritecii la *Helminthosporium turcicum* prin așezarea pe mediul Sachs a unor fragmente de paie de orz, tulpini de porumb, de sorg, frunze de porumb și cariopse de grîu și orz, sterilizate cu oxid de propilen.

175. **Sartory** (Sartory & al., 1950)

KH_2PO_4	1 g	Acid glutamic	6,5 g
$CaCl_2$	0,1 g	Acid folic	0,003 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Nicotinamidă	0,012 g
K_2SiO_3	0,3 g	Agar	20 g
Glucoză	40 g	Apă distilată	1 000 ml

Folosit pentru cultivarea dermatofiților.

176. **Schizophyllum** (Niederpruem, 1963)

Glucoză	20 g	K_2HPO_4	1 g
L-asparagină	2 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Clorhidrat de aneurină	100 µg	Agar „Noble"	20 g
KH_2PO_4	0,46 g	Apă distilată	1 000 ml

Pentru fructificare la *Schizophyllum commune.* Peptona poate înlocui L-asparagina (Raper & Krongelb, 1958).

177. **Schopfer**

Glucoză	10 g	Biotină	2,5 µg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Vitamina B_1	400 µg
KH_2PO_4	1,5 g	Inozitol	40 mg
Asparagină (recristalizată de două ori)	1 g	Apă distilată	1 000 ml

Mediu lichid pentru *Eremothecium ashbyi* (Y a w, 1952).

178. **Semințe**

A — Semințe sau cariopse de grîu, orz, ovăz, porumb, fasole, mazăre, sorg etc. se înmoaie sau se fierb în apă pînă devin moi și apoi se spală. Se pune în eprubete un strat de vată hidrofilă de 2—3 cm și deasupra un strat de 2 cm de semințe. Se adaugă apă pentru a umecta vata și baza stratului de semințe. Se sterilizează 40 minute la 121° sau două zile consecutiv 20 minute la 121°. Se poate folosi un singur fel de semințe sau un amestec (T u i t e, 1969; B o o t h, 1971 a). T u c k e r (R o y l e & H i c k m a n, 1964) înmoaie semințe nedecorticate de ovăz în apă distilată timp de 2—3 ore, elimină apa și le sterilizează 30 minute la 121°. Este recomandat pentru reproducerea sexuată la *Phytophthora cinnamomi.*

După M c D o n a l d (1959) un decoct din 100 g semințe de lucernă în 1 000 ml apă favorizează sporularea la *Alternaria brassicae.*

W h i t e h e a d (1957) înmoaie semințe de sorg timp de 12 ore, le spală, le pune în strat gros de 3 cm într-un flacon Erlenmeyer de 500 ml, adaugă 20 ml apă și sterilizează 45 minute la 121°. După sterilizare se agită pentru a separa semințele lipite. După 24 ore se sterilizează din nou timp de 100 minute. Dacă este necesar se mai adaugă 10 ml apă înainte de a doua sterilizare.

B — Semințele se pot pune în apă și se sterilizează fără o umectare prealabilă.

S i n d e n (A l t m a n, 1966) pune o parte grîu la 1,75 părți apă. Sterilizează 30 minute. Este recomandat pentru prepararea inoculului în vederea infestării solului cu ciuperci patogene.

B a g g a (1967) folosește 30 g orez nedecorticat și 60 ml apă. Se pune orezul și apa în flacoane de 500 ml și se sterilizează 30 minute la 127°. Se folosește pentru păstrarea ciupercilor la 10—13°.

H o d g s o n & G r a i n g e r (1963) încălzesc 100 g semințe de secară în 500 ml apă timp de 30 minute după care filtrează prin tifon, adaugă 5 g dextroză și diluează extractul cu un volum egal de apă. Se pun semințele în flacoane, în strat de 0,7 cm și se sterilizează 10 minute la 116°. Favorizează sporularea la *Phytophthora infestans* după incubare la 20° timp de 7 zile.

B r u e h l & N e l s o n (1964) prepară un mediu din 225 ml ovăz nedecorticat, măcinat, la care adaugă 100 ml apă de robinet. Se pune într-un borcan de conserve de 1,125 l acoperit cu dop de tifon. Se sterilizează 30 minute la 121°. Ziua următoare se adaugă 25 ml apă, se înlocuiește dopul cu o foaie de aluminiu și se sterilizează din nou. Este folosit pentru obținerea de inocul la *Cercosporella herpotrichoides.*

Purushothaman & al. (1968) folosește un mediu care reprezintă o modificare a mediului „Goto" și este constituit din 20 g semințe de orz spălate, 1 g frunze de orez tocate și 20 ml apă distilată.

Felix (1962) folosind semințe de floarea-soarelui, dovlecei, mazăre și soia obține stimularea formării de sporangi la *Phytophthora fragariae.*

C — Semințe-apă-agar. Satour & Butler (1967) folosesc pentru inducerea reproducerii sexuate la *Phytophthora capsici* și *P. parasitica* 100 g semințe cînepă, 20 g agar și 1 000 ml apă distilată.

Haasis & Nelson (1963) au folosit un decoct din semințe (10 părți semințe la o parte apă) adăugat la mediul apă-agar în proporție de 1 : 10 pentru a induce reproducerea sexuată la *Phytophthora.*

Satour (1967) spală 100 g semințe de napi *(Brassica napus),* le fierbe 30 minute într-un litru de apă distilată, filtrează extractul, aduce la volumul inițial, adaugă 20 g agar și sterilizează 15 minute la 121°. Se ajustează *p*H-ul la 7. Este indicat pentru producerea de oospori la *Phytophthora.*

După Booth (1971 a) semințele sterilizate se pot presăra pe plăci Petri cu mediu apă-agar 15%.

Taschdjian (1953) folosește următoarea rețetă : 20 g orez se pun în 1 000 ml apă și se fierb la foc încet ținînd vasul acoperit. Se filtrează prin sită și se răcește, se completează cu apă la un litru, se adaugă 20 g agar și se încălzește pentru topirea agarului. Se sterilizează 15 minute la 121°. Este recomandat pentru identificare la *Candida albicans.* Prin adăugare de 2% dextroză poate fi folosit în locul mediului cu făină de porumb pentru diferențierea dintre *Trichophyton mentagrophytes* și *T. rubrum* (Bocobo & Benham, 1949).

Pentru sporularea lui *Pyricularia oryzae* se folosește următorul mediu : 20 g orez glasat se pune în 500 ml apă într-un flacon mare, care să permită încălzirea în autoclav, fără presiune, timp de 15 minute. Se amestecă maceratul cu un mixer. Se adaugă 17 g agar topit în 500 ml apă. După sterilizare se agită flaconul pentru a evita depunerea orezului.

Fazli & Schroeder (1966) au folosit 30 g orez și 23 g agar pentru inducerea sporulării la *Helminthosporium oryzae.*

Un mediu compus din 3 g de semințe de orz, ovăz, mei sau porumb mărunțite și cernute, 2 g agar, 100 ml apă, pe care se așază cîteva fire de păr de cal, sterilizate, este favorabil formării cleistoteciilor la *Microsporum gypseum* (De Vroey, 1964).

D — Semințele, în special cele de cînepă, pot fi folosite și drept capcane. Se pun în apă peri radiculari sau pămînt. Se adaugă semințele de cînepă fierte, tăiate sau nu în două. Se vor izola ciupercile care cresc pe semințe.

Unele ciuperci acvatice dintre *Saprolegniaceae* și *Leptomitaceae* cresc bine pe semințe de cînepă puse în apă de lac sau de izvoare. Semințele de cînepă pot fi înlocuite cu porumb sau grîu. După Emerson (1959) semințele trebuie să fie viabile și fierte 10—20 minute.

Sideris (1931) descrie 12 medii de cultură, majoritatea preparate pe bază de semințe, folosite pentru cultivarea ciupercilor din familia *Pythiaceae.*

Barrett (1947) a reușit să izoleze și să cultive pe semințe de cînepă, în apă de robinet sterilă, pe *Rhizophagus,* ciupercă endofită.

179. **Soia-agar** (Smoot & al., 1958)

Făină de soia	15 g
Agar	20 g
Apă distilată pînă la	1 000 ml

Folosit pentru obținerea oosporilor la *Phytophthora infestans*, în culturi ținute în întuneric la 20°.

180. **Sol**

Se umplu pe jumătate eprubete sau flacoane McCartney cu pămînt de grădină cernut printr-o sită fină și se sterilizează 30 minute la 127°. Se sterilizează din nou după o săptămînă pentru a distruge toate organismele termorezistente care au supraviețuit primei sterilizări. Se inoculează solul și se umezește în același timp cu 2—3 ml de suspensie de spori și/sau țesuturi în apă distilată, sterilă. Se incubează culturile 10—14 zile apoi se păstrează la 3—6°. Pentru reactivare se presară cîteva particule de sol pe o placă Petri cu mediu proaspăt.

Este recomandat pentru conservarea ciupercilor (Anonim, 1968; Booth, 1971 a). Galleymore (1949) a obținut fructificații de *Lentinus tuber-regium* pe acest mediu.

181. **Sol (extract)-agar**

	A	B	C	D	E	F
Glucoză	—	—	—	10 g	—	1 g
Sucroză	1 g	—	—	—	—	—
Drojdie uscată	0,1 g	—	—	—	—	—
$NaNO_3$	—	—	—	1 g	—	—
K_2HPO_4	—	—	4 g	1 g	0,2 g	0,5 g
KH_2PO_4	0,2 g	—	1,5 g	—	—	—
Roz bengal	—	—	—	67 mg	—	—
Streptomicină (sulfat)	—	—	50 mg	—	—	50 mg
Cloramfenicol	—	—	50 mg	—	—	50 mg
Clorotetraciclină	—	—	50 mg	—	—	—
Agar	15—25 g	15 g	15 g	15 g	15 g	20 g
Extract de sol	1 000 ml	1 000 ml	25 ml	1 000 ml	1 000 ml	100 ml

Prepararea extractului de sol: 1 kg sol de grădină se amestecă cu 1 000 ml apă de robinet, se încălzește 30 minute, se decantează, se filtrează și se completează la 1 000 ml.

A — Mediul Flentje (1965). Extractul se prepară prin agitare timp de 24 sau 48 ore a amestecului sol-apă, fără fierbere, și filtrarea prin vată de sticlă. Folosit pentru inducerea formării bazidiilor la *Corticium praticola*.

B — Preparat de Miller & al. (1951).

C — Folosit de Menzies & Griebel (1967) pentru izolarea lui *Verticillium dahliae* din sol. Green & Papavizas (1968) recomandă adăugarea a 2 g/l de acid poligalacturonic. Antibioticele se includ după sterilizare.

D — Mediul Smith & Dawson (1944). Extractul se prepară din 500 g humus.

E — Se sterilizează 20 minute la 121° și se acidifică cu acid lactic înainte de folosire.

F — Se sterilizează 15 minute la 117°. Se adaugă 900 ml apă de robinet și se sterilizează 15 minute la 117° (Kaufman & al. 1963).

G — Mediul Wills (1954). Se prepară un extract prin fierbere, timp de o oră, a 300 g sol uscat în 1 000 ml apă. Particulele solide se elimină prin filtrare la vacuum. Se sterilizează 15 minute la 121°, în cantități de 20—30 ml. Recomandat pentru inducerea formării de sporangi la *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Se cultivă ciuperca 3—5 zile pe mediul bulion de cartof-dextroză și apoi se trece pe mediul Wills.

H — Kwon-Chung (1967) obține cleistotecii abundente la specii de *Nannizzia* pe un mediu cu următoarea compoziție: 1 000 ml extract de sol, 2 g glucoză, 1 g extract drojdii și 15 g agar la care s-a adăugat (la fiecare 300 ml) 2 g de păr uman tocat și sterilizat.

182. **Spalding** (1972)

NH_4NO_3	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,5 g
KH_2PO_4	2,5 g
Pectină	5 g
Polipectat de Na	5 g
Apă dublu distilată	1 000 ml

Pectina și polipectatul se dizolvă separat și apoi se amestecă cu soluția de săruri minerale, se ajustează pH-ul la 5 și se sterilizează. Folosit pentru studiul producerii de enzime pectinolitice și celulozolitice de către *Rhizopus stolonifer*.

183. **Steinberg**, I (1936, 1945)

	mg/l
NH_4NO_3	1 794,6
KNO_3	191,7
KH_2PO_4	236,7
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	101,5
$(NH_4)_2SO_4$	48,4

Microelemente: Fe 0,20; Mo 0,02; Zn 0,18; Cu 0,04; Mn 0,02 mg/l. Se adaugă sucroză în concentrație de 50 g/l. Toate elementele sînt în cantități minime pentru a asigura maximum de creștere la *Aspergillus niger*.

184. **Steinberg**, II (Thom & Steinberg, 1939)

D-Manitol	50 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,88 mg
$NaNO_2$	2 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,20 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 mg	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,12 mg
K_2HPO_4	0,35 mg	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0,05 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 mg	Apă distilată	1 000 ml

Folosit pentru studiul nutriției la *Aspergillus niger*. Se ajustează pH-ul la 4 cu H_2SO_4 și se sterilizează 20 minute la 120°.

185. **Stoner** (1967)

Concentrat alimentar dietetic „Metrecal" sau „Sego"	50 ml
Agar	15 g
Apă	1 000 ml

„Metrecal" (produs de Edward Dalton Co., Evansville, Ind.) și „Sego" (produs de Pet Inc., St. Louis, Mo.) conțin hidrați de carbon, proteine, lipide, vitamine și elemente minerale. Se sterilizează 15 minute la 121°. pH = 6,5. Din 24 specii de ciuperci testate, 20 au crescut mai bine pe acest mediu decît pe cartof-dextroză-agar sau extract de drojdii și malț.

186. **Sucroză-prolină-agar** (S h o e m a k e r, 1962)

Sucroză	6 g	$FeSO_4$	10 mg
Prolină	2,7 g	$ZnSO_4$	2 mg
K_2HPO_4	1,3 g	$MgCl_2$	1,6 mg
KH_2PO_4	1 g	Agar	20 g
KCl	0,5 g	Apă distilată	1 000 ml
$MgSO_4$	0,5 g		

Folosit pentru inducerea sporulării la *Drechslera* incubată la 20°, în întuneric.

187. **Sucroză-tartrat şi azotat de amoniu** (B e a d l e, 1944)

Sucroză	20 g	B	0,01 mg
KH_2PO_4	1 g	Mo	0,02 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g	Fe	0,2 mg
Tartrat de amoniu	5 g	Cu	0,1 mg
NH_4NO_3	1 g	Mn	0,02 mg
NaCl	0,1 g	Zn	2 mg
$CaCl_2$	0,1 g	Biotină	5 mg
Apă distilată	1 000 ml		

Folosit pentru teste cu colină şi inozitol la izolate de *Neurospora crassa.*

188. **Tochinai** (1916)

Peptonă	10 g
KH_2PO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Maltoză	20 g
Apă	1 000 ml

Folosit pentru stimularea sporulării la *Fusarium oxysporum.*

189. **Tomate (suc)-sare-agar** (C h r i s t e n s e n, după T u i t e, 1969)

	A	B
Suc de tomate (Tomato juice Agar „BBL" sau „Difco")		
NaCl	100 g	100 g
Agar	—	15 g
Apă	1 000 ml	1 000 ml

„Tomato juice agar" se prepară conform indicaţiilor de pe ambalaj. Folosite pentru izolarea ciupercilor de depozit de pe seminţe. În reţeta B se diluează mediul „Tomato juice agar" la 1/2 cu apă.

190. **Trione-sintetic** (T r i o n e, 1964)

Sucroză	20 g
L-asparagină	3 g
KH_2PO_4	613 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 mg
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	114 mg
CaCl	55,5 mg
Dietilentriamin pentaacetat de Na şi Fe	20 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3,52 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,38 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,031 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,025 mg
Clorhidrat de aneurină	5 mg
Apă distilată	1 000 ml

Se prepară cu sau fără agar. Se ajustează pH-ul la 6. Recomandat pentru producerea de teliospori la *Tilletia controversa.*

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

191. Trione-cereale-agar (Trione, 1964)

Amestec de cereale (porumb, grîu,		Agar	15 g
ovăz şi orz) produs de „Gerber“	50 g	Clorhidrat de aneurină	5 mg
Sucroză	15 g		

Este folosit pentru producerea de teliospori la *Tilletia controversa.*

192. Tubeuf

NH_4NO_3	10 g
K_3PO_4	5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
Acid lactic	2 g
Apă distilată	1 000 ml

Recomandat pentru cultivat *Serpula lacrymans* (Rapilly, 1968; Booth, 1971 *a*).

193. Turel (1973)

Fiecare litru de mediu conţine :

a. *Soluţia Knop îmbogăţită :* (poate fi păstrată îngheţată, în concentraţie dublă)

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	2 g
KNO_3	0,25 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
KH_2PO_4	0,25 g
NH_4NO_3	20 mg

b. K_2HPO_4 0,75 g
Agar (Bacto agar „Difco“) 15 g

c.

Sucroză	50 g
$Fe(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$	139 mg
EDTA-2Na	134 mg
$MnSO_4$	895 mg
KI	20 mg

d.

Acid aspartic	300 mg
Cisteină	28 mg
Cistină	39,6 mg
Alanină	14,7 mg
Metionină	24,6 mg
Glutation	50,7 mg
Apă distilată	100 ml

La soluţia *c*, pentru prevenirea opacizării, azotatul de fier se dizolvă primul iar celelalte ingrediente se adaugă pe rînd.
Soluţia Knop îmbogăţită *(a)* împreună cu ingredientele *(c, d)* se amestecă la 2 × concentraţia finală şi se sterilizează, după ce s-a încălzit la 60°, printr-un filtru millipore (tip HA 0,45 μm). Un volum egal din soluţia *b*, la 2 × concentraţia finală, se sterilizează 15 minute la 118°. Soluţia sterilizată *(b)*, fierbinte, se amestecă cu soluţia filtrată *(a + c + d)* şi apoi se distribuie cîte 5 ml în eprubete. pH-ul final 3,4—4,5. Folosit pentru cultivarea lui *Melampsora lini.*

194. Ullscheck

Sucroză	50 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
KNO_3	10 g	Agar	30 g
K_2HPO_4	8 g	Apă distilată	1 000 ml

Se sterilizează prin încălzire la 100° timp de 30 minute, trei zile consecutiv. pH-ul este de 5,4 (Booth, 1971 *a*).

195. Ulm (extract)-agar (Hart, 1960)

Rumeguş sau talaş din arbori vii incluzînd scoarţă, alburn şi duramen	120 g
Agar	40 g
Apă distilată	2 400 ml

Se fierbe la foc mic talaşul în 1 500 ml apă timp de 10 minute. Se strecoară prin sită. Materialul rămas se spală cu apă distilată şi se strecoară peste primul filtrat pentru a completa la un volum

final de 2 400 ml. Se pun cîte 240 ml soluție în flacoane de 500 ml, se adaugă 4 g de agar, se încălzește pînă la dizolvarea agarului și apoi se sterilizează 15 minute la 121°. Este folosit pentru detectarea lui *Ceratocystis ulmi*. Se inoculează pe mediu bucăți de lemn de 0,5 cm grosime obținute din ramuri de 0,5—1,2 cm. După 5—7 zile la 22—25° se formează coremiile.

196. **Usturoi-agar**

Usturoi	300 g
Agar	20 g
Apă distilată	1 000 ml

Se curăță, se taie și se fierbe usturoiul în apă timp de o oră. Se filtrează și se completează la volumul inițial cu apă distilată. Se adaugă agarul și se sterilizează 20 minute la 121°.

Recomandat pentru formarea bazidiilor la *Sclerotium* (Booth 1971 *a*).

197. **V-8 Juice-agar**

	A	B	C	D	E	F
V-8 juice *	200 ml	200 ml	100 ml	300 ml	200 ml	200 ml
$CaCO_3$	—	3 g	2 g	4,5 g	3 g	1 g
Dextroză	—	—	—	—	5 g	—
Glucoză	—	—	—	—	—	2 g
Extract drojdii	—	—	—	—	2 g	—
Bilă de bou	—	—	—	—	5 g	1 g
Agar	20 g	15 g	15 g	15 g	20 g	—
Apă distilată	800 ml	800 ml	900 ml	700 ml	—	800 ml

* Conține suc de tomate, morcovi, țelină, sfeclă, pătrunjel, salată, spanac, *Nasturtium officinale* și este produs de „Campbell Soup Co.".

Este o completare a mediului descris de Mrak & al. (1942) care conține un extract din morcovi, sfeclă, castraveți și cartofi.

A — Se dizolvă agarul în apă și se adaugă sucul. Se ajustează pH-ul la 6 cu soluție de NaOH 10%. Se sterilizează 20 minute la 121° (Anonim, 1968).

B — Stimulează sporularea la multe specii (Diener, 1955; Miller, 1955).

C — Folosit pentru producerea de sporangi la *Phytophthora parasitica* și *P. palmivora* (Hine & Aragaki, 1963).

D — Se clarifică V-8 juice cu $CaCO_3$ și se centrifughează la 3 000 rot./min. Două sute ml din supernatant se completează la un litru cu apă. Folosit pentru producerea de organe de înmulțire sexuată la *Phytophthora infestans* (Romero & Gallegly, 1963).

E — Se sterilizează 15 minute la 117°. După sterilizare, cînd mediul are 48°, se adaugă 1 g propionat de Na, 30 mg clorotetraciclină și 30 mg streptomicină. Este indicat pentru izolarea ciupercilor din sol (Papavizas & Davey, 1959).

F — Se filtrează și se ajustează pH-ul la 5,2. Bila de bou, împreună cu 0,5 g PCNB, 20 mg nistatin, 100 mg streptomicină (sulfat) și 2 mg clorhidrat de clortetraciclină se prepară în soluție apoasă care se adaugă după sterilizare cînd mediul a ajuns la temperatura de 50—55°. Folosit pentru izolarea lui *Thielaviopsis basicola* din sol (Papavizas, 1965).

198. V-8 sintetic (Hylin & al., 1970)

Aminoacizi (mg) :	
Asparagină	6,20
Arginină	1,13
Acid glutamic	2,44
γ-NH_2-butiric	4,78
Clorhidrat de cistidină	0,75
Clorhidrat de lizină	0,74
Tirozină	1,30

Vitamine (μg) :	
Aneurină	5
Riboflavină	3
Niacină	80
Pantotenat de Ca	26,2
Clorhidrat de piridoxină	18
Acid folic	0,53
Vitamina B_{12}	0,003
Biotină	0,18
Vitamina C	180

Minerale (mg) :	
KH_2PO_4	8,5
Na_2HPO_4	8,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	34,8
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	66
Na_4EDTA	0,5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,69
$CuSO_4 \cdot H_2O$	0,21
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,3
Na_2MoO_4	0,013
H_3BO_3	0,9
Sucroză	3,1

Folosit în cercetări privind creşterea şi sporularea la *Alternaria tomato*.

199. Vogel (1956)

Citrat de sodiu	150 g
KH_2PO_4 anhidru	250 g
NH_4NO_3	100 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5 g
Soluţie microelemente	5 ml
Biotină (soluţie)	2,5 ml
Apă distilată	750 ml
Sucroză	20 g/l
(sau 10 g sucroză şi 10 g glicerină/l)	
Agar (dacă este necesar)	15 g/l

Se adaugă 2 ml cloroform pentru conservat.

Pentru folosire se diluează mediul de 50 ori cu apă distilată. pH = 5,8.

Soluţia de microelemente :	
Acid citric $\cdot H_2O$	5 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	1 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,25 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05 g
H_3BO_3 anhidru	0,05 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,05 g
Apă distilată	95 ml

Se dizolvă succesiv, se adaugă 1 ml cloroform pentru conservat la temperatura camerei.

Biotină „Merk" soluţie	5 mg
Apă distilată	50 ml

Se păstrează îngheţată.

Folosit pentru creşterea lui *Neurospora*.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

200. **Vogel, mediu „minimal"** (Vogel, 1964)

Glucoză	10 g
Clorhidrat de aneurină	200 µg
Biotină	50 µg
Acid p-aminobenzoic	200 µg
Apă	1 000 ml

Pentru ciupercile cu creștere dificilă se adaugă, după Child & al. (1973), următoarele :

Asparagină	1,5 g/l
dl-histidină HCl	20 mg/l
dl-metionină	20 mg/l
l-triptofan	10 mg/l
KH_2PO_4	0,5 g/l

201. **Volkonsky** (Reischer, 1951)

K_2HPO_4	0,1 g	Alanină	1 g
$MgCl_2$	0,1 g	Glucoză	1 g
Fe_2Cl_6	0,01 mg	Apă	1 000 ml
Clorhidrat de cisteină	0,05 g		

Se ajustează pH-ul la 7 cu NaOH. Recomandat pentru creșterea *Saprolegniaceelor.*

202. **Waksman** (Waksman & Fred, 1922)

Glucoză	10 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
Peptonă	5 g	Agar	20—25 g
KH_4PO_4	1 g	Apă distilată	1 000 ml

Se ajustează pH-ul la 4 prin adăugarea de soluție normală de H_2SO_4 sau H_3PO_4. Se sterilizează 30 minute la 104°. Mediu special pentru evaluarea numărului de ciuperci din sol.

203. **Whiffen** (Reischer, 1951)

K_2HPO_4 }	0,005 M	$CaCl_2$	0,001 M
KH_2PO_4 }	(pH = 6)	Cistină	0,001 M
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,002 M	Acid glutamic	0,05%
$FeSO_4$	0,00002 M	Glucoză	0,5%
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,000001 M		

Recomandat pentru creșterea *Saprolegniaceelor.*

204. **Williams & al.** (1966 ; 1967)

La ingredientele minerale și sucroză ale mediului Czapek-Dox cu pH 6,4 se adaugă 1% extract de drojdii „Difco" trecut prin rășini schimbătoare de ioni, 0,1% peptonă „Evans" și 1% Bacto agar „Difco". Se sterilizează 15 minute la 121°. Inoculînd mediul cu uredospori de *Puccinia graminis* f. *sp. tritici,* obținuți prin cultură pe frunze în condiții de sterilitate, s a realizat atît creșterea vegetativă cît și producerea de uredo- și teliospori. Pe acest mediu s-a obținut și creșterea lui *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Singleton & Young, 1968) și *Melampsora lini* (Turel, 1969). Bushnell & Rajendren (1970) suplimentează mediul cu hidrolizat de cazeină iar Coffey & Allen (1973) au reușit să crească pe *Melampsora lini* și *Puccinia helianthi* pe mediul Williams, modificat. Prin folosirea, pentru însămînțarea sporilor pe mediu, a unei soluții de gelatină 15% în loc de apă, se obține o sporulare mai bună (Coffey & al., 1970). Mussell & Staples (1973) utilizează ca inocul 50 mg de stromă formată în culturi axenice, fragmentată cu un mixer.

4.2. Culturi pe frunze detașate

Se folosesc aproape în exclusivitate pentru creșterea și menținerea ciupercilor fitopatogene, în special a celor din ordinele *Erysiphales, Uredinales* și *Peronosporales* care, în majoritate, nu cresc pe medii nutritive sintetice. Metoda constă în detașarea frunzelor, sau doar a unor fragmente, inocularea cu sporii ciupercii și apoi menținerea lor în stare vie, timp de cîteva zile sau cîteva săptămîni, pe diferite medii lichide sau solide. După Tuite (1969) culturile pe frunze detașate au avantajul economiei de spațiu, de material vegetal și inocul, a unui control facil al temperaturii și iluminării, al ușurinței observației și al eliminării aproape totale a contaminărilor, ceea ce le face foarte adecvate în cercetările pentru determinarea patogenității, a raselor fiziologice, a testării fungicidelor și în studiile de genetică.

După Yarwood (1946), Hooker & Yarwood (1966) și Tuite (1969), la cultivarea ciupercilor pe frunze detașate trebuie respectate următoarele condiții :

Manipularea materialului vegetal și prepararea soluțiilor nu se fac în condiții de asepsie, dar este necesar să se lucreze cît mai curat. Frunzele de la plantele crescute în seră sînt de preferat celor de la plantele din cîmp. Se colectează frunze bine dezvoltate, de vîrstă medie, evitîndu-se folosirea celor foarte tinere sau a celor de la plante îmbătrînite. Colectarea se va face după amiaza cînd conținutul în glucide și proteine este crescut.

Deși frunzele unor specii se pot păstra timp destul de îndelungat în apă, cel mai des se folosește o soluție de sucroză 2—10%. Pentru prelungirea viabilității frunzelor se poate adăuga chinetină 0,4—40 ppm, benzimidazol 30—100 ppm (cantitatea poate crește la 1 240 ppm în cazul frunzelor de porumb), sau N^6-benziladenină, singure sau în diferite combinații. Pentru inhibarea bacteriilor se poate adăuga 10 ppm aureomicină. Includerea de substanțe minerale sau a umectanților favorizează dezvoltarea microorganismelor contaminate.

Modul de lucru : Soluția se toarnă în vase Petri. Imediat după detașare, sau la un interval foarte scurt, frunzele se inoculează cu sporii ciupercii și se pun, cu fața inoculată în sus, pe suprafața soluției, după care vasul Petri se acoperă cu capacul. Dacă frunza a fost detașată împreună cu pețiolul, atunci acesta se imersează în soluție. Frunzele înguste, cum sînt cele de la *Gramineae,* se pot crește în flacoane sau borcane. Aceste frunze se montează, în poziție verticală, în discuri din polistiren expandat care plutesc pe soluție, iar partea bazală a frunzelor, secționată, se cufundă în lichid. În mod obișnuit nu este necesară schimbarea soluției în timpul experimentului.

Pentru a înlesni manipularea materialelor, frunzele se pot cultiva pe hîrtii de filtru îmbibate cu soluții, sau soluțiile se pot solidifica prin adăugare de 0,25—1% agar.

Vasele Petri sau flacoanele cu frunze se păstrează la temperatura camerei (20—24°) sau alte temperaturi în funcție de necesitățile plantei și ciupercii studiate. Pentru prelungirea viabilității frunzele trebuie expuse la lumină naturală, evitîndu-se însă expunerea directă la lumina solară. Dacă este necesar se poate suplimenta iluminarea cu lămpi fluorescente „reci", care asigură o intensitate de 1 000—2 000 lucși.

Bibliografie

ACHA, I. G. & VILLANUEVA, J. R. (1961) — *Nature, Lond.*, 189 : 328.
ALEXOPOULOS, C. J. (1960) — *Am. J. Bot.*, 47 : 37—43.
— & BENEKE, E. S. (1968) — „Laboratory Manual for Introductory Mycology". Burgess Publishing Co., Minneapolis.
ALLEN, M. & SOIKE, K. (1966) — *Science, N. Y.*, 154 : 155—157.
ALTMAN, J. (1966) — „Phytopathological Techniques. Laboratory Manual". Pruett Press Inc., Boulder.
AMES, L. M. (1961) — „A Monograph of the *Chaetomiaceae*". U. S. Army Res. and Develop. Serie, No. 2.
ANDERSEN, A. A. (1943) — *J. Bact.*, 46 : 396—397.
ANDLEIGH, H. S. (1960) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 12 : 159—162.
ANONIM (1948) — *Nature, Lond.*, 162 : 920.
— (1953) — „Difco Manual", Ed. 9, Difco Lab., Detroit.
— (1959) — Baltimore Biological Laboratory (BBL). 1959 Products Catalog, Baltimore.
— (1968) — „Plant Pathologist's Pocketbook". Commonwealth Mycological Institute, Kew.
ARK, P. A. & DICKEY, R. S. (1950) — *Phytopathology*, 40 : 389—390.
ARMSTRONG, G. M. & ARMSTRONG, J. K. (1960) — *Tech. Bull. U. S. Dep. Agric.* No. 219.
ASCHNER, M. & KOHN, S. (1958) — *J. gen. Microbiol.*, 19 : 183.
ASTHANA, R. P. & HAWKER, L. E. (1939) — *Ann. Bot.*, 50 : 325—343.
BACKUS, M. P. & STAUFFER, J. F. (1955) — *Mycologia*, 47 : 429—463.
BADCOCK, E. C. (1941) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 25 : 200—205.
BAGGA, H. S. (1967) — *Pl. Dis. Reptr*, 51 : 747—750.
BARNETT, H. L. (1952) — *Phytopathology*, 42 : 2.
— (1953) — *Mycologia*, 45 : 450—457.
BARRETT, J. T. (1947) — *Phytopathology*, 37 : 359—360.
BEADLE, G. W. (1944) — *J. biol. Chem.*, 156 : 683—689.
— & TATUM, E. L. (1945) — *Am. J. Bot.*, 32 : 678—686.
BEECH, F. W. & DAVENPORT, R. R. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 153—182. Academic Press, London & New-York.
BEEVER, R. E. & BOLLARD, E. G. (1970) — *J. gen. Microbiol.*, 60 : 273—279.
BELL, D. K. & CRAWFORD, J. L. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 939—941.
BENEDEK, T. (1940) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 2 : 267—316.
— (1950) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 5 : 14—64.
— (1950) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 17 : 255—260.
BENJAMIN, R. K. (1958) — *Aliso*, 4 : 150.
BERK, S., EBERT, H. & TEITELL, L. (1957) — *Ind. Engng. Chem.*, 49 : 1117.
BERLINER, M. D. (1962) — *Mycologia*, 53 : 84—90.
BERRY, J. A. & MAGOON, C. A. (1934) — *Phytopathology*, 24 : 780—796.
BIOURGE, P. (1923) — *La Cellule*, 33 : 7—331.
BLACKBURN, F. & HAYES, W. A. (1963) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 46 : 449—452.
BLAKESLEE, A. F. (1915) — *Phytopathology*, 5 : 68—69.
BLANK, I. H. & TIFFNEY, W. N. (1936) — *Mycologia*, 28 : 324—329.
BLOCHWITZ, A. (1930) — *Annls Mycol.*, 28 : 241—268.
BOCOBO, F. C. & BENHAM, R. W. (1949) — *Mycologia*, 41 : 291—302.
BOJANOVSKY, R. (1938) — *Zentbl. Bakt. ParasitKde Abt. II*, 99 : 55—60.
BONNER, J. & ADDICOTT, F. (1937) — *Bot. Gaz.*, 99 : 144—170.
BOONE, D. M. & KEITT, G. W. (1956) — *Am. J. Bot.*, 43 : 266—233.
BOOTH, C. (1971*a*) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology" Vol. 4 : 49—94. Academic Press, London & New York.
— (1971*b*) — „The Genus *Fusarium*". Commonwealth Mycological Institute, Kew.
BOOTH, T. & MILLER, C. E. (1968) — *Mycologia*, 60 : 480—495.
BOSE, R. G. (1963) — *Nature, Lond.*, 198 : 505—506.
BOUHOT, D. & BILLOTTE, J. M. (1964) — *Annls Epiphyt.*, 15 : 45—56.
BROWN, W. (1924) — *Ann. Bot.*, 38 : 401—404.
— (1925) — *Ann. Bot.*, 39 : 373—408.
— (1926) — *Ann. Bot.*, 40 : 224.
BRUEHL, G. W. & NELSON, W. L. (1964) — *Pl. Dis. Reptr*, 48 : 863—865.

BRUMMELEN, J. van (1967) — *Persoonia*, 1 (supl.) : 1—260.
BUCKLEY, H. R. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 461—478. Academic Press, London & New York.
BUDDENHAGEN, I. W. (1958) — *Am. J. Bot.*, 45 : 355—365.
— & YOUNG, R. A. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 93—101.
BULLER, A. H. (1931) —„Researches on Fungi", Vol. 6. Longmans, Green & Co., London, New York, Toronto.
BUMP, C. M. & KUNZ, L. J. (1968) — *Appl. Microbiol.*, 16 : 1503—1506.
BURKHOLDER, P. R. (1943) — *Am. J. Bot.*, 30 : 206—211.
BUSHNELL, W. R. & RAJENDREN, R. B. (1970) — *Phytopathology*, 60 : 1287.
CALVERT, O. H., WILLIAMS, L. F. & WHITEHEAD, M. D. (1960) — *Phytopathology*. 50 : 136—137.
CAPPELLINI, R. A. & PETERSON, J. L. (1965) — *Mycologia*, 57 : 962—966.
CARLILE, M. J. (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 237—265. Academic Press, London & New York.
CHACE, W. G. & URLAUB, G. S. (1942) — *Am. Dyest. Reptr*, 31 : 331—333.
CHILD, J. J., KNAPP, C. & EVELEIGH, D. E. (1973) — *Mycologia*, 65 : 1078—1086.
CH'IN, T. L. (1938) — *Proc Soc. exp. Biol. N. Y.*, 38 : 700—702.
CHU, D. (1970) — *Bi-mon. Res. Notes*, 26 (?) : 48.
CLARK, J. W. (1962) — *Rep. For. Prod. Lab., Madison*, No. 2262.
CLAUS, D. (1959) — *Naturwissenschaften*, 46 : 536.
CLAUSSEN, P. (1912) — *Z. Bot.*, 4 : 1.
COCHRANE, V. W. (1958) — „Physiology of Fungi". J. Wiley & Sons, New York.
CODNER, R. C. (1969) — In Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 1 : 427—454. Academic Press, London & New York.
COFFEY, M. D. & ALLEN, P. J. (1973) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 60 : 245—260.
— BOSE, A. & SHAW, M. (1970) — *Can. J. Bot.* 47 : 1291—1293.
CONVERSE, R. H. & SHEROISHI, K. K. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 807—809.
COOKE, W. B. (1954) — *Antibiotics Chemother.*, 4 : 657—662.
— (1963) — „A Laboratory Guide to Fungi in Polluted Waters, Sewage and Sewage Treatment Systems". U. S. Dep. Helth, Education and Welfare, Cincinnati.
— (1968) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 34 : 305—316.
— & BUSCH, K. A. (1957) — *Sewage Ind. wastes*, 29 : 210—217.
CRUICKSHANK, I. A. M. (1953) — *N. Z. Jl Sci. Technol. Sect. B*, 34 : 248.
CUPPETT, V. M. & LILLY, V. G. (1973) — *Mycologia*, 65 : 67—77.
CZAPEK, F. (1902) — *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, 1 : 540—560.
— (1903) — *Beitr Chem. Physiol. Pathol.*, 3 : 47—66.
DADE, H. A. (1960) — In „Herb. I. M. I. Handbook", p. 40—69. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
DANIEL, J. W. & RUSCH, H. P. (1961) — *J. gen. Microbiol.*, 25 : 47.
DARLOW, H. M. (1969) — In Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 1 : 169—204. Academic Press, London & New York.
DAVIES, J. D. (1969) — *Pl. Soil.*, 31 : 179—181.
DEVERALL, B. J. (1968) — In Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. (Ed.) „The Fungi", Vol. 3 : 129—135. Academic Press, New York & London.
DE VROEY, C. (1964) — *Anals Soc. belge Méd. trop.*, 44 : 831—840.
DHAVANTARI, B. N. (1967) — *Can. J. Bot.*, 45 : 1525—1543.
DICK, M. W. (1965) — *Mycologia*, 57 : 828—831.
DIEHL, W. W. (1916) — *Phytopathology*, 6 : 336—340.
DIENER, U. L. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 141—145.
DIMOND, A. E., PLUMB, G. H., STODDARD, E. M. & HORSFALL, J. C. (1949) — *Bull. Conn. agric. Exp. Stn*, No. 531.
DOWSON, W. J. (1957) — „Plant Diseases due to Bacteria". Cambridge University Press, Cambridge.
DOX, A. W. (1910) — *Bull. U. S. Dep. Agr. Bur. Animal Ind.*, No. 120.
DUCHÉ, J., NEU, J. & HOAREAU, M. (1949) — *Revue Mycol.*, 14 : 129—131.
DULANEY, E. L. & GRUTTER, F. H. (1950) — *Mycologia*. 42 : 654—657.
ECKERT, J. W. & TSAO, P. H. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 771—777.
EGGINS, H. O. W. & PUGH, G. J. F. (1962) — *Nature, Lond.*, 193 : 94—95.
EILERS, F. I. (1972) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 59 : 347—349.
ELLIOTT, E. C. & GEORGALA, D. L. (1969) — In Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (Ed.) „Methods in Microbiology", Vol. 1 : 1—20. Academic Press, London & New York.
ELLIOTT, J. A. (1917) — *Am. J. Bot.*, 4 : 439—476.
EMERSON, R. (1941) — *Lloydia*, 4 : 77—144.
— (1959) — *Mycologia*, 50 : 589—621.

— (1968) — In Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. (Ed.) „The Fungi", Vol. 3 : 105—128. Academic Press, London & New York.
EPSTEIN, S. S. & SNELL, F. D. (1940) — *Archs Derm. Syph.*, 42 : 308—311.
FAZLI, S. F. I. & SCHROEDER, H. W. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 507—509.
FELIX, E. L. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 9.
FERGUS, C. L. (1954) — *Mycologia*, 46 : 435—441.
FISCHER, J. B. & KANE, J. (1968) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 35 : 223—229.
FLENTJE, N. F. (1956) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 39 : 343—356.
FOLLIN, J. C. (1971) — *Coton Fibr. trop.*, 26 : 467.
FOTHERGILL, P. G. & YEOMAN, M. M. (1957) — *J. gen. Microbiol.*, 17 : 631—639.
FRIES, L. (1955) — *Svensk bot. Tidskr.*, 49 : 475—535.
FRIES, N. (1938) — *Symb. bot. upsal.*, 3(2) : 1—188.
— (1949) — *Physiologia Pl.*, 2 : 78—102.
FULLER, M. S. & POYTON, R. O. (1964) — *Bioscience*, 14 : 45—46.
FUSARO, R. M. (1972). — *Appl. Microbiol.*, 23 : 174—176.
GAERTNER, A. (1970). — *Helgoländer wiss. Meeresunters*, 20 : 29—38.
GALLEYMORE, B. H. (1949) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 32 : 315—317.
GAMS, W. (1960) — *Sydowia*, 14 : 295—307.
GARRETT, S. D. (1946) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 29 : 171—172.
GAYED, S. K. & HASSAN, H. M. (1966) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 29 : 355—365.
GHAFOOR, A. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 1167—1171.
GIDDINGS, N. J. (1924) — *Phytopathology*, 14 : 342.
GINDRAT, D. (1965) — *Bull. Soc. bot. suisse*, 75 : 183—218.
— (1966) — *Bull. Soc. bot. suisse*, 76 : 157—175.
GOLDSTEIN, S. & MORIBER, L. (1966) — *Arch. Mikrobiol.*, 53 : 1—11.
GOODE, M. J. (1958) — *Phytopathology*, 48 : 79—83.
GOODING, G. V. & LUCAS, G. B. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 277—281.
GOOS, R. D. & TSCHIRSCH, M. (1963) — *Mycologia*, 54 : 353—367.
GORMAN, J. W. (1967) — *Am. J. med. Technol.*, 33 : 151—157.
GRAHAM, J. H. R., ZEIDERS, R. W. & BRAVERMAN, S. W. (1963) — *Pl. Dis. Reptr*, 47 : 255—256.
GRAY, W. D., PINTO, P.V.C. & PATHAK, S. G. (1963) — *Appl. Microbiol.*, 11 : 501—503.
GREEN, R. J. & PAPAVIZAS, G. C. (1968) — *Phytopathology*, 58 : 567—570.
GRESLAGS, J. H. & SWIFT, M. E. (1957) — *Mycologia*, 49 : 305—317.
GUPTA, P. K. & SINGH, R. P. (1970) — *Indian J. Anim. Health*, 9 : 21—23.
GUSTAFSSON, M. (1965) — *LantbrHögsk. Annlr*, 31 : 405—457.
GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I. & BARNES, B. (1927) — „The Structure and Development of the Fungi". Cambridge University Press, Cambridge.
HAASIS, F. A. & NELSON, R. R. (1963) — *Pl. Dis. Reptr*, 47 : 705—709.
HAGLUND, W. A. & KING, T. H. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 315—317.
HANSEN, H. N. & SNYDER, W. C. (1947) — *Phytopathology*, 37 : 369—371.
HANUSOVA, M. (1964) — *Ceská Mykol.*, 18 : 48—52.
HARNISH, W. N. (1965) — *Mycologia*, 57 : 85—90.
HARROLD, C. E. (1950) — *Ann. Bot.*, 14 : 127—148.
HART, J. H. (1960) — *Pl. dis. Reptr*, 44 : 806—807.
HAYNES, W. C., WICKERHAM, L. J. & HESSELTINE, C. W. (1955) — *Appl. Microbiol.*, 3 : 361—368.
HENDRIX, J. W. (1965) — *Phytopathology*, 55 : 790—797.
— (1967) — In Kelman, A. & al. (Ed.). „Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology". p. 37—38. Freeman & Co., San Francisco & London.
— & APPLE, J. L. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 984—994.
HERRICK, J. A. (1942) — *Phytopathology*, 32 : 636—637.
HESSELTINE, C. W. (1954) — *Mycologia*, 46 : 358—366.
HICKMAN, C. J. & GOODE, P. M. (1953) — *Nature, Lond.*, 172 : 211—212.
HILTY, J. W. & SCHMITTHENNER, A. F. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 859—862.
HINE, R. B. & ARAGAKI, M. (1963) — *Phytopathology*, 53 : 1194—1197.
HOAGLAND, D. R. & ARON, D. I. (1950) — *Circ. Calif. agric. Exp.* No. 347.
HODGSON, W. A. (1958) — *Can. J. Pl. Sci.*, 38 : 145—154.
— & GRAINGER, P. N. (1963) — *Can. J. Pl. Sci.*, 44 : 583.
HOLLIDAY, P. & MOWAT, W. P. (1963) — *Phytopath. Pap.*, 5.
HOLLOMON, D. W. (1965) — *Pl. Path.*, 14 : 34—35.
HOOKER, A. L. & YARWOOD, C. E. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 536—539.
HOPKINS, E. F. (1921) — *Phytopathology*, 11 : 491—494.
HORNBY, D. (1964) — „The Survival of *Colletotrichum coccodes* in Greenhouse Soils and Related Problems". Ph. D. Thesis, Univ. of Nottingham.

— & ULLSTRUP, A. J. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 76—82.
HORNE, A. S. & MITTER, J. H. (1927) — *Ann. Bot.*, 41 : 519—547.
HORNSTEIN, E. A. & CANTINO, E. C. (1961) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 44 : 185—198.
HORTON, J. C. & KEEN, N. T. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 908—916.
HOTSON, H. H. (1942) — *Mycologia*, 34 : 391—399.
HULEA, A. (1969) — „Ghid pentru laboratoarele de micologie și bacteriologie". Editura Agro-Silvică, București.
HUNT, R. S. & COBB, F. W. (1971) — *Can. J. Bot.*, 49 : 2064—2065.
HYLIN, J. W., HYLIN, V. & ARAGAKI, M. (1970) — *Mycologia*, 62 : 200—202.
INGOLD, C. T. & DRING, V. G. (1957) — *Ann. Bot.*, 21 : 465—477.
ITÔ K. & HAYASHI, H. (1971) — *Bull. Govt Forest Exp. Stn Meguro, No.* 236 : 93—113.
IULIUS, A. A. & BAZINOV, A. G. (1963) — *Mikrobiologiya*, 32 : 143—147.
JEFFERYS, E. G., BRIAN, P. W., HEMMING, H. G. & LOWE, D. (1953) — *J. gen. Microbiol.*, 9 : 314—341.
JOFFE, A. Z. (1963) — Mycologia, 55 : 271—282.
JOHANN, H. (1923) — *Phytopathology*, 13 : 710.
JOHANSEN, D. A. (1940) — „Plant Microtechnique". McGraw-Hill, New York.
JOHNSON, A. L. S. (1971) — *Bi-mon. Res. Notes*, 27(2) : 15.
JOHNSON, T. W. & SPARROW, F. K. (1961) — „Fungi in Oceans and Estuaries". J. Cramer, Weinheim.
— & TUCKER, G. W. (1954) — *Mycologia*, 46 : 384—385.
JONES, D. R. (1972) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58 : 29—36.
JONES, E. B. G. (1971) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology" Vol. 4 : 335—365. Academic Press, London & New York.
KAUFMAN, D. D., WILLIAMS, L. E. & SUMNER, C. B. (1963) — *Can. J. Microbiol.*, 9 : 743—744.
KEAY, M. A. (1953) — *Pl. Path.*, 2 : 103.
KEITT, G. W. & LANGFORD, M. H. (1941) — *Am. J. Bot.*, 28 : 805—820.
KERR, N. S. & SUSSMAN, M. (1958) — *J. gen. Microbiol.*, 19 : 173—177.
KILPATRICK, R. A. & JOHNSON, H. W. (1956) — *Phytopathology*, 46 : 180—181.
KLARMAN, W. L. & CRAIG, J. (1960). *Phytopathology*, 50 : 863.
KLAUSMEIER, R. E., KANZIG, J. L., JONES, W. A. & HAMMERSLEY, V. L. (1963). *Devs. ind. Microbiol.*, 4 : 306—313.
KNOX-DAVIS, P. S. (1965) — *S. Afr. J. agric. Sci.*, 8 : 205.
KO, W. H. & HORA, F. K. (1971) — *Phytopathology*, 61 : 899.
KOCH, W. J. (1968) — „Fungi in the Laboratory". The Book Exchange, Chapel Hill.
KOTHEIMER, J. B. & CHRISTENSEN, C. M. (1961) — *Wallerstein Labs Commun.*, 24 : 21—27.
KUEHN, H. H., ORR, G. F. & GHOSH, G. R. (1961) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 14 : 214—229.
KUEHNER, C. C. (1951) — *Mycologia*, 43 : 390.
KUHLMAN, E. G. & HENDRIX, F. F. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 1310—1312.
KURTZMAN, R. H. (1973) — *Mycologia*, 65 : 236—239.
KWON-CHUNG, K. J. (1967) — *Sabouraudia*, 6 : 5—13.
LA BRIJN, J. & KAUFFMAN, H. R. (1970) — OECD Intern. Biodegrad. Res. group. Report No. 70/19.
LACY, M. L. & BRIDGMAN, G. H. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 1310—1312.
LAMBERT, E. B. (1957) — *Pl. Dis. Reptr*, 41 : 903.
LANGE, M. (1952) — *Dansk bot. Ark.*, 14 (6) : 1—164.
LANGERON, M. & VANBREUSEGHEM, R. (1952) — „Précis de Mycologie". Masson et Cie, Paris.
LATHAM, A. J. & LINN, M. B. (1961) — *Pl. Dis. Reptr*, 45 : 866—867.
LEACH, C. M. (1965) — *Mycologia*, 54 : 926—928.
— (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 609—664. Academic Press, London & New York.
LEONIAN, L. H. (1924) — *Am. J. Bot.*, 11 : 19—50.
— (1934) — *Bull. W. Va. Univ. agric. Exp. Stn*, No. 262
LILLY, V. G. & BARNETT, H. L. (1951) — „Physiology of the Fungi". McGraw-Hill, New York.
LITTMAN, M. L. (1947) — *Science, N. Y.*, 106 : 109—111.
LITTRELL, R. H. & EPPS. W. M. (1965) — *Pl. Dis. Reptr*, 49 : 649—653.
LLANOS, C. M. & LOCKWOOD, J. L. (1960) — *Phytopathology*, 50 : 826—830.
LOCKWOOD, J. L. & BALLARD, J. C. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 406—410.
LOQUIN, M. (1948) — *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 227 : 149—150.
LUKENS, R. J. (1960) — *Phytopathology*, 50 : 867—868.
— & SISLER, H. D. (1968) — *Phytopathology*, 48 : 235—244.
LUTTRELL, E. S. (1958) — *Phytopathology*, 48 : 281—287.

McCALLAN, S. E. A., WELLMAN, R. H. & WILCOXON, F. (1939) — *Contr. Boyce Thompson Inst. Pl. Res.*, 11 : 49—77.
McCREADY, R. M., OWENS, H. S. & MACLAY, W. D. (1943) — *Science, N. Y.*, 97 : 428.
McDONALD, W. C. (1959) — *Can. J. Pl. Sci.*, 39 : 409—416.
MACHACEK, J. E. (1934) — *Phytopathology*, 24 : 301—303.
MACHLIS, L. (1953) — *Am. J. Bot.*, 40 : 189—195, 450—460.
McINTOSH, D. L. & SNETH, B. (1972) — *Proc. Can. phytopath. Soc.*, 38 sess. No. 39.
MacLAREN, J. A. (1961) — *Mycologia*, 52 : 142—152.
McLEAN, R. C. & COOK, W. R. I. (1941) — „Plant Science Formulae". McMillan & Co., London.
MADELIN, M. F. — (1956) — *Ann. Bot.*, 20 : 307—330.
MADUEWESI, J. N. C. & NWAUZO, E. E. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 1336—1337.
MALKA, I. & ULLSTRUP, A. J. (1962) — *Bull. Torrey bot. Club*, 89 : 240—249.
MARTIN, J. P. (1950) — *Soil Sci.* 69 : 215—232.
MATHUR, R. S., BARNETT, H. L. & LILLY, V. G. (1960) — *Phytopathology*, 40 : 104—114.
MEHRLICH, F. P. (1934) — *Phytopathology*, 24 : 1127—1128.
MENZIES, J. D. & GRIEBEL, G. E. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 703—709.
MERZ, W. G., BERGER, C. L. & SILVA-HUNTER, M. (1970) — *Archs Derm.*, 102 : 545—547.
MESROBEANU, L., MARX, A., STAVRI, D. & TEODORESCU, G. (1961) — „Mediile de cultură în bacteriologia medicală". Ed. Medicală, Bucureşti.
MILLER, C. E. (1967) — *Mycologia*, 59 : 524—527.
MILLER, J. J., PEERS, D. J. & NEAL, R. W. (1951) — *Can. J. Bot.*, 29 : 26—31.
MILLER, P. M. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 461—462.
MITCHELL, J. E. & YANG, C. Y. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 917—922.
MOORE-LANDECKER, E. (1972) — „Fundamentals of the Fungi". Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs.
MOREAU, C., MOREAU, M. & PELHATE, J. (1964) — *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 80 : 234—246.
MORTON, D. J. (1961) — *Mycologia*, 52 : 658—661.
MORTON, H. E. (1957) — *Science, N. Y.*, 126 : 1248.
MOSSERAY, P. (1934) — *La Cellule*, 43 : 203—265.
MOYER, A. J., WELLS, P. A., STUBBS, J. J., HERRICK, H. T. & MAY, O. E. (1937) — *Ind. Engng Chem.*, 29 : 777—781.
MRAK, E. M., PHAFF, H. J. & DOUGLAS, H. C. (1942) — *Science, N. Y.*, 96 : 432.
MUKERJI, K. G. & RAO, V. R. (1968) — *Pl. Soil.*, 29 : 331—332.
MUNDKUR, B. B. (1934) — *Indian J. Sci.*, 4 : 779.
MUSSELL, H. W. & STAPLES, R. C. (1973) — *Phytopathology*, 63 : 653—654.
NADAKAVUKAREN, M. J. & HORNER, C. E. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 527—528.
NASH, S. M. & SNYDER, W. C. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 567—572.
NESTORESCU, N. (1965) — (Ed.) „Bacteriologie Medicală". Ed. Medicală, Bucureşti.
NETZER, D. & DISHON, I. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 795—796.
NIEDERPRUEM, D. J. (1963) — *J. Bact.*, 85 : 1300—1308.
NILSSON, S. (1964) — *Symb. bot. upsal.*, 18(2) : 1—130.
NOBLES, M. K. (1965) — *Can. J. Bot.*, 43 : 1097—1139.
OPPENHEIMER, C. H. & ZOBELL, C. (1952) — *J. mar. Res.*, 11 : 10—18.
OTTOW, J. C. G. (1972) — *Mycologia*, 64 : 304—315.
PADY, S. M., KRAMER, C. L. & PATHAK, V. K. (1961) — *Mycologia*, 52 : 347—350.
PAPAVIZAS, G. C. (1965) — *Phytopathology*, 55 : 1475—1478.
— (1967) — *Phytopathology*, 57 : 848—852.
— & AYERS, W. A. (1965) — *Mycologia*, 56 : 816—830.
— & DAVEY, C. B. (1959) — *Soil Sci.*, 88 : 112—117.
— & — (1960) — *Am. J. Bot.*, 47 : 758—765.
PAPPELIS, A. J. & SCHMID, W. E. (1965) — *Mycologia*, 57 : 974—975.
PARK, D. (1961) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 44 : 377—390.
— (1973) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 60 : 148—151.
PERROT, P. E. (1960) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 43 : 19—30.
PHILLIPS, D. J. (1971) — *Phytopathology*, 61 : 906.
PIEPER, E. J., HUMPHREY, C. J. & ACREE, S. F. (1917) — *Phytopathology*, 7 : 214—220.
PISANO, M. A., CARSON, J. H. & FLEISCHMAN, A. I. (1962) — *Can. J. Microbiol.*, 8 : 277—279.
PONCHET, J. (1965) — „Étude des Communautés Mycropéricarpiques du Caryopse de Blé". Thèse Fac. Sci., Univ. Paris.
PONTECORVO, G. (1953) — *Adv. Genet.*, 4 : 141—238.
PURUSHOTHAMAN, D., RAGUNATHAN, V. & MAHADEVAN, A. (1968) — *Pl. Dis. Reptr*, 52 : 703.
RAABE, R. D. & WILHELM, S. (1958) — *Pl. Dis. Reptr*, 42 : 817.

RAICU, C. & COICEV, A. (1967) — *An. Inst. Centr. Cerc. agric., Sect. Prot. Pl.*, 3 : 65—73.
RAPER, J. R. (1937) — *Science, N. Y.*, 85 : 342.
— (1940) — *Mycologia*, 32 : 710—727.
— & KRONGELB, G. S. (1958) — *Mycologia*, 50 : 707—740.
RAPER, K. B. (1937) — *J. agric. Res.*, 55 : 289—316.
— & FENNELL, D. I. (1965) — „The Genus *Aspergillus*". Williams & Wilkins Co., Baltimore.
RAPILLY, F. (1968) — „Les Techniques de Mycologie en Pathologie Végétale". *Annls Épiphyt.*, 19 (hors-série) : 1—102.
RAULIN, J. (1869) — *Annls Sci. nat. (Bot.)*.. 2 : 201.
RAUTELLA, G. S. & COWLING, E. B. (1966) — *Appl. Microbiol.*, 14 : 892—898.
REID, C. P. P. (1966) — *Pl. Dis. Reptr*, 50 : 345.
REISCHER, H. S. (1951) — *Mycologia*, 43 : 142—155.
REMSBERG, R. E. (1940) — *Mycologia*, 32 : 52—96.
RICHARDS, G. S. (1951) — *Phytopathology*, 41 : 571—578.
RIGLER, N. E. & GREATHOUSE, G. A. (1940) — *Science, N. Y.*, 92 : 363—364.
RIKER, A. J. & RIKER, R. S. (1936) — „An Introduction to Research on Plant Diseases". J. S. Swift, St. Louis.
ROBBINS, W. J. & HERVEY, A. (1959) — *Mycologia*, 50 : 745—752.
— & — (1962) — *Mycologia*, 52 : 946—957.
ROGERSON, C. T. (1958) — *Trans. Kans. Acad. Sci.*, 61 : 155—168.
ROMANOWSKI, R. D. & KUĆ, J. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 1259—1263.
ROMERO, S. & GALLEGLY, M. E. (1963) — *Phytopathology*, 53 : 899—903.
ROXON, J. E. & BATRA, L. R. (1973) — *Mycologia*, 65 : 1036—1043.
ROY. B. S. & RAY, J. N. (1944) — *Curr. Sci.*, 13 : 98—99.
ROYLE, D. J. & HICKMAN, C. J. (1964) — *Can. J. Bot.*, 42 : 311—318.
RUSAN, M. (1973) — „Contribuții la studiul biologiei ciupercii *Trichothecium roseum* (Pers.) Link, cu implicații în producerea trichothecinei". Teză doctorat, Inst. Biol. „Tr. Săvulescu", București.
RUSSELL, P. (1956) — *Nature, Lond.*, 177 : 1038—1039.
RYAN, F. J. (1950) — *Meth. med. Res.*, 3 : 51—75.
SABOURAUD, R. (1910) — „Maladies du Cuir Chevelu. III.-Les Maladies Cryptogamiques. Les Teignes". Masson et Cie, Paris.
SARTORY. A SARTORY R., MEYER, J. & SCHURMANN, W. (1950) — *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 230 : 1608—1609.
SASANO, K. T. & MEDLAR, E. M. (1943) — *Am. Rev. Tuberc. pulm. Dis.*, 48 : 297—303.
SATOUR, M. M. (1967) — *Mycologia*, 59 : 161—166.
— & BUTLER, E. E. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 510—515.
SCHEFFER, R. P. & WALKER, J. C. (1953) — *Phytopathology*, 43 : 116—125.
SCHEIN, R. D. & KERELO, J. W. (1956) — *Pl. Dis. Reptr*, 40 : 814—815.
SCHMITTHENNER, A. F. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 1133—1138.
— & HILTY, J. W. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 582—583.
SCHNEIDER, I. R. (1956) — *Pl. Dis. Reptr*, 40 : 816—821.
SCHONBORN, C. (1966) — *Zentbl. Bakt. ParasitKde Abt. I.*, 201 : 406—411.
SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. (1966) — *Int. Jnl syst. Bact.*, 16 : 313—340.
SHOEMAKER, R. A. (1962) — *Can. J. Bot.*, 40 : 809—836.
SIDERIS, C. P. (1931) — *Mycologia*. 24 : 252—295.
SINGER, R. (1962) — „The *Agaricales* in Modern Taxonomy", Hafner, New York.
SINGH, R. S. & MITCHELL, J. E. (1961) — *Phytopathology*, 51 : 440—441.
— & NENE, Y. L. (1965) — *Pl. Dis. Reptr*, 49 : 114—118.
SINGLETON, L. L. & YOUNG, H. C. (1968) — *Phytopathology*, 58 : 1068.
SLEETH, B. (1945) — *Phytopathology*, 35 : 1030—1031.
SLOAN, B. J., ROUTIEN, J. B. & MILLER, V. P. (1961) — *Mycologia*, 52 : 47—63.
SMITH, G. (1949) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 32 : 280—283.
— (1960) — „An Introduction to Industrial Mycology". Ed. 5, Edward Arnold, London.
— (1971) — „An Introduction to Industrial Mycology". Ed. 6, Edward Arnold, London.
SMITH, N. R. & DAWSON, N. T. (1944) — *Soil Sci.*, 58 : 467—471.
SMOOT, J. J., GOUGH, F. J., LAMEY, H. A., EICHENMULLER, J. J. & GALLEGLY, M. E. (1958) — *Phytopathology*, 48 : 165—171.
SNETH, B. (1972) — *Can. J. Microbiol.*, 18 : 1389—1392.
SNYDER, W. C. & HANSEN, H. N. (1947) — *Phytopathology*, 37 : 369—371.
—, NASH, S. M. & TRUJILLO, E. E. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 310.
SOBERS, E. K. & SEYMOUR, C. P. (1963) — *Phytopathology*, 53 : 1443—1446.
SPALDING, D. H. (1972) — *Phytopathology*, 53 : 929—931.
SRINIVASAN, M. C., NARASIMHAN, M. J. & THIRUMALACHAR, M. J. (1964) — *Mycologia*, 56 : 683—691.

STAMPS, D. J. (1952) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 35 : 248—253.
STEINBERG, R. A. (1936) — *J. agric. Res.*, 52 : 439—448.
— (1945) — *Pl. Physiol.*, 20 : 600—608.
STEINER, G. W. & WATSON, R. D. (1965) — *Phytopathology*, 55 : 728—730.
STOCKDALE, P. M. (1971) — In Booth, C. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 429—460. Academic Press, London & New York.
STONER, M. F. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 447.
SUNDSTROM, K.-R. (1964) — *Symb. bot. upsal.*, 18(3) : 1—89.
SWARTZ, D. (1934) — *Mycologia*, 26 : 193.
SYKES, G. (1969) — In Norris, J. R. & Ribbons, D. W. (Ed.). „Methods in Microbiology", Vol. 1 : 77—121. Academic Press, London & New York.
TAKASHIO, M. & VANBREUSEGHEM, R. (1966) — *Annls Soc. belge Méd. trop.*, 46 : 421—432.
TALBOY, P. W. (1960) — *Pl. Path.*, 9 : 57—58.
TASCHDJIAN, C. L. (1953) — *Mycologia*, 45 : 474—475.
TATUM, E. L., BARRATT, R. W. & CUTTER, V. M. (1949) — *Science, N. Y.*, 109 : 509—517.
THEIL, C. C., BURTON, H. & McCLEMONT, J. (1952) — *Proc. Soc. appl. Bact.*, 15 : 53.
THOM, C. (1930) — „The Penicillia". Baillière, Tindall and Cox, London.
— & STEINBERG, R. A. (1939) — *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 25 : 329—335.
THOMPSON, H. C. & GERDEMANN, J. W. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 167.
THURSTON, H. D. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 186.
TIMNICK, M. B., BARNETT, H. L. & LILLY, V. G. (1952) — *Mycologia*, 44 : 141—149.
TITSWORTH, E. H. & GRUNBERG, E. (1950) — *Mycologia*, 42 : 298.
TOCHINAI, Y. (1916) — *Coll. Agr. Hokkaido Imperial Univ.*, 14 : 171—236.
TOMSOFF, W. J. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 113.
TRIBE, H. T. & MABADEJE, S. A. (1972) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 58 : 127—137.
TRIONE, E. J. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 592—596.
TSAO, P. H. (1964) — *Phytopathology*, 54 : 549—555.
— (1970) — *A. Rev. Phytopath.*, 8 : 157—186.
TUITE, J. (1969) — „Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria". Burgess Publ. Co., Minneapolis.
TUREL, F. L. M. (1969) — *Can. J. Bot.*, 47 : 821—823.
— (1973) — *Can. J. Bot.*, 51 : 131—134.
TYNER, L. E. (1944) — *Soil Sci.*, 57 : 271—274.
ULKEN, A. (1965) — *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, 9 : 289—295.
VISCHNIAC, H. S. (1956) — *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole*, 111 : 410—414.
VOGEL, H. J. (1956) — *Microbial Genetics Bull. No.* 13 : 42—43
— (1964) — *Am. Nat.*, 98 : 435—446.
WAKSMAN, S. A. (1922) — *J. Bact.*, 7 : 339—341.
— & FRED, E. B. (1922) — *Soil Sci.*, 14 : 27—28.
WALSETH, C. S. (1952) — *TAPPI*, 35 : 228—233.
WARCUP, J. H. (1950) — *Nature, Lond.*, 166 : 117—118.
— (1963) — *Nature, Lond.*, 197 : 1317—1318.
WATSON, R. D. (1961) — *Pl. Dis. Reptr*, 45 : 289.
—, CARLEY, H. E. & HUBER, D. M. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 352
WEARY, P. E. & GRAHAM, G. F. (1966) — *J. invest. Derm.*, 47 : 55—57.
WEAVER, E. A., CORDON, T. C. & JOHN, H. J. (1953) — *Mycologia*, 45 : 307—309.
WEITZMAN, I. & SILVA-HUNTER, M. (1967) — *Sabouraudia*, 5 : 335—340.
WELLMAN, F. L. (1943) — *Phytopathology*, 33 : 617—619.
WESTERGAARD, M. & MITCHELL, H. K. (1947) — *Am. J. Bot.*, 34 : 573—577.
WESTSTEIJN, G. & OKAFOR, N. (1971) — *Neth. J. Pl. Path.*, 77 : 134—139.
WHITEHEAD, M. D. (1957) — *Phytopathology*, 47 : 450.
WHITNEY, H. S. & PARMETER, J. R. (1963) — *Can. J. Bot.*, 41 : 879—886.
WILLIAMS, L. E. & SCHMITTHENNER, A. C. (1956) — *Circ. agric. Exp. Stn Ohio, No.* 39.
WILLIAMS, P. G., SCOTT, K. J. & KUHL, J. L. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 1418—1419.
—, —, — & MACLEAN, D. J. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 320—327.
WILLS, W. H. (1954) — *J. Elisha Mitchell scient. Soc.*, 70 : 235—243.
WOODS, R., BLOOS, H. E. & GRIES, G. A. (1967) — *Phytopathology*, 57 : 228.
YANG, C. Y. & SCHOULTIES, C. L. (1972) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 46 : 5—15.
YARWOOD, C. E. (1946) — *Bot. Rev.*, 12 : 1—56.
YAW, K. E. (1952) — *Mycologia*, 44 : 308.
ZENTMYER, G. A., SNYDER, W. C. & HANSEN, H. N. (1950) — *Phytopathology*, 40 : 971.
ZINKERNAGEL, H. (1967) — OECD Technical Memorandum, 27/DAS/CSI/M/974.

Capitolul 5

Conservarea

5.1. Conservarea ciupercilor în stare vie

5.1.1. Introducere

Nu numai organele de rezistenţă, specializate, ale ciupercilor pot supravieţui timp îndelungat dar şi alte părţi, uneori chiar elementele de reproducere vegetativă, au o longevitate considerabilă. În general, factorii care favorizează, în condiţii naturale, păstrarea viabilităţii sînt deshidratarea şi/sau temperatura scăzută.

Durata supravieţuirii diferă în funcţie de organ. Conidiile sînt mai puţin viabile decît miceliul, uredosporii au o viaţă mai scurtă decît teliosporii, sporangii la *Peronosporaceae* sînt viabili doar cîteva ore, în timp ce oosporii pot rezista 25 ani etc. Ciupercile legate de mediul acvatic *(Mastigomycotina)* sînt mai puţin viabile decît ciupercile „superioare" *(Basidiomycotina)*. Chiar în cadrul unui grup relativ omogen ca *Heterobasidiomycetes* reprezentanţii familiei *Tilletiaceae* au o longevitate mai mare decît cei ai familiei *Ustilaginaceae* (Fischer, 1936).

În tabelul 7 sînt cuprinse cîteva recorduri de longevitate semnalate în literatură (vezi şi Fennell, 1960; Sussman, 1968).

Tabelul 7

VIABILITATEA NATURALĂ A CIUPERCILOR ÎN DIFERITE CONDIŢII DE CONSERVARE

Numele taxonului şi organul	Suportul şi condiţiile de păstrare	Viabilitate	Autorul
Fumago vagans (spori)	Herbar	67 ani	Collett (1921)
Ustilaginales (teliospori)	Herbar	10—25 ani	Fischer (1936)
Verticillium (scleroţi)	În sol	14 ani	Wilhelm (1955)
Erysiphe graminis (cleistotecii)	Herbar	13 ani	Moseman & Powers (1956)
Pythium (oospori)	Sol uscat, temp. camerei	12 ani	Hoppe (1966)
Ustilago nuda (teliospori)	Seminţe orz	11 ani	Porter (1955)
Phymatotrichum omnivorum (scleroţi)	În sol umed	4 ani	Taubenhaus & Ezekiel (1934)
Cercospora kikuchii (miceliu)	În tulpini de soia	42 luni	Kilpatrick (1956)
Cercospora beticola (miceliu)	În resturi de plante de sfeclă	39 luni	Solel (1970)
Cercospora beticola (conidii)		3 săpt.	Solel (1970)

Deoarece pentru unele cercetări, cum ar fi cele privitoare la rezistența plantelor față de anumite ciuperci parazite, este nevoie de un inocul care să poată fi folosit timp îndelungat, s-au încercat diferite metode pentru prelungirea viabilității naturale a sporilor. Aproape toate cercetările de acest fel s-au îndreptat asupra *Uredinalelor* și *Peronosporaceelor* ciuperci care, cu unele excepții, nu se pot cultiva in vitro.

Metodele principale pentru prelungirea viabilității naturale sînt liofilizarea și conservarea în azot lichid. Tehnicile sînt aproape identice cu cele descrise la conservarea culturilor (5.1.7 ; 5.1.8.) unde sînt indicate și rezultatele obținute în conservarea sporilor obținuți de pe plante (tabelele 10 și 11).

O metodă foarte utilizată este conservarea la temperaturi scăzute a sporilor sau a suspensiilor de spori. Influența temperaturii asupra duratei viabilității ciupercilor este foarte clar evidențiată de Flor (1954), care a obținut următoarele rezultate la conservarea uredosporilor de *Melampsora lini :* 7 zile la 13—43°, 18 zile la 20—34°, 24 zile la 19—25°, 300 zile la 3° și 1295 zile la —10°.

În tabelul 8 sînt cuprinse rezultate obținute prin conservarea la temperaturi scăzute a sporilor de la diferite ciuperci (vezi și Mazur, 1968).

Tabelul 8

VIABILITATEA CIUPERCILOR CONSERVATE LA TEMPERATURI SCĂZUTE

Specia și organul	Temperatura de conservare	Viabilitatea	Autorul
Phytophthora phaseoli (sporangi)	—60° —13...—18°	476 zile 150 zile	Hyre & Ettinger (1968)
Erysiphe graminis (cleistotecii)	10°	13 ani	Moseman & Powers (1956)
Venturia inaequalis (conidii)	—10°	1—2 ani	Rich (1970, 1971)
— „ —	—10...—40°	15 luni	Hamilton & Weaver (1943)
Diferiți zoopatogeni	—24°	1 săpt.— 4 luni	Tesh & al. (1967)
Uromyces phaseoli (uredospori)	—60°	2 ani	Schein (1962)
Puccinia graminis (teliospori)	8—10°	2—6 ani	Johnson (1941)
Uredinales (uredospori 12 specii)	5—15°	55—270 zile	Maneval (1924a)
Melampsora lini (uredospori)	3°	9—13 ani	Flor (1967)

Deși, după cum s-a putut observa din datele prezentate, unele ciuperci au o viabilitate îndelungată care, prin diferite mijloace poate fi prelungită, totuși, metoda cea mai bună pentru păstrarea pe termen lung în stare vie a ciupercilor este obținerea lor în culturi și conservarea culturilor.

Conservarea ciupercilor în stare vie, în prezența sau absența suportului de cultură, are două obiective : asigurarea viabilității și păstrarea carac-

terelor ereditare (Braendle, 1963). Dacă în prelungirea viabilității s-a ajuns la rezultate remarcabile, în ceea ce privește păstrarea caracterelor morfologice, a capacității de sporulare, a proprietăților biochimice etc., rezultatele sînt destul de contradictorii. Răspunsul diferit al ciupercilor față de aceeași metodă de conservare se datorește variabilității.

Acordul dintre specialiști este aproape unanim doar în cîteva aspecte ale tehnicii de conservare, cum ar fi evitarea transferării repetate, la intervale scurte și efectul favorabil al păstrării la temperaturi scăzute. Din această cauză Goos & Pollack (1965), recomandă conservarea concomitent prin mai multe metode, iar Dade (1960), consideră că : „conservarea ciupercilor este încă, aproape în întregime, o artă empirică". Ciupercile se pot conserva fie sub formă de culturi (transfer periodic, sub ulei, în sol, deshidratate, congelate), fie sub formă de spori, conidii sau micelii (în apă distilată, deshidratate, liofilizate, în azot lichid).

Pentru inițiere în conservarea ciupercilor, în afara unei activități practice obligatorii în care, în afară de ordine, spiritul de observație și imaginația sînt cerințe de bază, este necesară consultarea cel puțin a lucrărilor lui Fennell (1960), Martin (1963), Tuite (1969), Iizuka & Hasegawa (1970) și Onions (1971 *a*; 1971 *b*).

5.1.2. Transferul periodic

Transferul periodic este cea mai veche, cea mai criticată, aproape cea mai folosită metodă pentru conservarea culturilor și, pentru unele grupe de ciuperci, singura. Are avantajul că în orice moment culturile sînt disponibile pentru comparație sau transfer dar este cea mai laborioasă metodă, necesitînd alegerea unui mediu potrivit, folosirea unei cantități mari de spori pentru transfer, atenție permanentă pentru a înlătura pericolul contaminărilor sau înlocuirilor etc. (Fennell, 1960). Nu este indicată pentru colecțiile mari deși, la cea mai mare colecție din lume, CBS-Baarn, este folosită ca metodă principală pentru conservarea a aproape 20 000 sușe.

În vederea conservării prin transfer, ciupercile se cultivă aproape întotdeauna pe medii agarizate. Nu există un mediu standard unic, cele mai folosite fiind : cartof-dextroză-agar, malț-agar, Czapek, cartof-morcov-agar, Sabouraud. După Fennell (1960) un mediu de conservare potrivit este acela pe care se obține o creștere minimă a miceliului și o dezvoltare maximă a fructificațiilor. Westerdijk (1947) recomandă ca mediile bogate în substanțe nutritive să fie alternate cu cele sărace, să se folosească concentrații reduse de hidrați de carbon, un pH neutru, medii cu extracte din plante și alegerea, prin testare, a condițiilor de temperatură, lumină și umiditate. O practică de peste 60 ani la Centraalbureau voor Schimmelcultures — Baarn a dovedit că păstrarea fiecărei sușe concomitent pe două medii, unul sărac și altul bogat și alternarea lor cu ocazia fiecărui transfer, este o metodă excelentă. Pentru ciupercile care formează fructificații în țesuturile gazdelor *(Coelomycetes, Ascomycetes)* dar și pentru unele *Hyphomycetes* cu fructificații superficiale, includerea în medii a unor porțiuni de plante, favorizează formarea acestora.

La transferul pe mediu proaspăt se vor folosi spori sau conidii, iar cînd ciuperca nu sporulează se va transfera miceliu de la marginea activă a

coloniei. Cu unele excepții transferarea unor fragmente din mediul vechi, odată cu miceliul, favorizează apariția variantelor sterile. Insuccesul transferului nu este dovada pierderii viabilității culturii ci, uneori, doar a sporilor. Culturile vechi, uscate, pot fi reactivate prin introducerea de apă sterilă distilată în eprubete (Carpenter, 1932; Drechsler, 1949; Castellani, 1967) sau turnarea de mediu proaspăt, cald, peste cultură (Povah, 1927; Wilhelm, 1955). Smith, (1971) recomandă răzuirea culturii vechi, uscate, prepararea unei suspensii din materialul obținut în 3 ml apă sterilă și inocularea pe mediu proaspăt în vas Petri. Imediat după inoculare pe eprubete trebuie notate: numele speciei, numărul de colecție, mediul și data inoculării. Aceste date se scriu sau cu un creion special pentru sticlă sau, mai bine, pe etichete de hîrtie care se lipesc pe eprubete. Hacskaylo (1960) recomandă folosirea unor etichete de policlorură de vinil, transferabile.

După inoculare culturile trebuie incubate în condiții care să favorizeze sporularea. În mod obișnuit temperatura de 20—25° este potrivită pentru majoritatea ciupercilor, dar o temperatură mai scăzută (15°) este necesară la ciupercile acvatice și una mai ridicată pentru cele termofile. Necesitățile de lumină sînt variate și trebuie stabilite prin testare. Unele specii sporulează bine la întuneric, altele la lumina zilei, difuză, altele direct la lumină solară. Pentru speciile cu pigmentație naturală, lumina în spectru apropiat de UV (3100—400 Å) („Black light"), continuă, sau alternînd 12 ore lumină cu 12 ore întuneric, este cea mai indicată.

Pentru conservarea culturilor se folosesc eprubete de sticlă închise cu dopuri de vată, de spumă de material plastic (Chu, 1970), de aluminiu, cauciuc (Antheunisse, 1972) sau flacoane de sticlă cu capace de aluminiu și garnituri de cauciuc (flacoane „McCartney") (Dade, 1960). Recent s-a propus utilizarea unor tuburi de polistiren (Onions, 1969) sau eprubete din același material (Smith, 1972) prevăzute cu capace care se pot închide ermetic. Acestea din urmă au avantajul că sînt gata sterilizate și permit expunerea culturilor la „black-light" pentru stimularea sporulării.

Modul de închidere a recipientelor în care se păstrează culturile este foarte important, deoarece schimbul de gaze și evaporarea au loc pe această cale. Închiderea ermetică, considerată multă vreme dăunătoare conservării îndelungate a culturilor (Fennell, 1960; Raper, 1963) se dovedește un mijloc foarte eficace în prelungirea perioadei dintre două transferuri, cu condiția ca etanșarea completă să se facă numai după ce ciuperca a sporulat abundent. Închiderea ermetică a eprubetelor sau flacoanelor a permis păstrarea timp de 3—10 ani a viabilității culturilor, ținute la temperatura camerei (Grasso, 1957; Antheunisse, 1972). Încetinirea evaporării se poate face și prin aplicarea, peste dopurile de vată, a unor foi de celofan și parafină (Gupta, 1947) sau pelicule de material plastic. După Reynolds & Lock (1968) culturile păstrate la 5° timp de 22 luni pierd 5% din greutate dacă eprubetele sînt acoperite cu folii din policlorură de vinil sau polietilenă, 78% dacă sînt acoperite cu capace de material plastic neetanș și 98% dacă sînt acoperite cu dopuri de vată.

Intervalul de timp între două transferuri depinde de viteza de deshidratare a mediului și temperatura de conservare. La culturile în eprubete închise cu dopuri de vată transferul trebuie făcut la 3—6 luni dacă

CONSERVAREA culturile sînt păstrate la temperatura camerei, la 6—8 luni dacă sînt conservate în camere reci cu temperatura de 16—17° și umiditatea relativă a aerului de 60—70% (sistem folosit la CBS-Baarn) și la un an, un an și jumătate, dacă se păstrează în frigider la 5°. Deși s-au semnalat cazuri de viabilitate a culturilor păstrate în laborator, uscate, timp de 3 1/2—14 ani (Verona, 1946; Wilhelm, 1955), păstrarea în eprubete sau flacoane închise ermetic, la temperatura de 4—5° este, probabil, cea mai bună soluție în cazul conservării prin transfer periodic, intervalul dintre două transferuri putînd fi prelungit la 2—3 ani (Smith, 1971). În experimente pentru conservarea speciilor de *Cercospora*, cele mai bune rezultate le-am obținut prin acoperirea eprubetelor, peste dopurile de vată, cu folii de polietilenă, și păstrarea la 5—8° în frigider. În acest fel culturile au fost transferate la 2—3 ani și s-a păstrat tot o dată și tipul normal „wilde type".

Conservarea la 5° este suportată bine de majoritatea ciupercilor (Fennell, 1960). Maneval (1924 b), Hesseltine (1947), Kreitlow (1950) și Sinski & al. (1968) semnalează diferite recorduri de longevitate (1 1/2—8 ani) la specii de *Fusarium, Aspergillus, Penicillium, Sclerotinia, Urocystis, Coccidioides,* unele *Mucoraceae* etc. Speciile de *Pythium, Phytophthora* și *Piptocephalis* nu supraviețuiesc însă la temperaturi apropiate de 0° (Scandiffio, 1928; Onions 1971 a). Pentru conservarea în frigider, așezarea eprubetelor în poziție orizontală, pe tăvi perforate sau din sîrmă, este procedeul cel mai bun (Raper & Thom 1949; White & Darby, 1952).

Culturile pot fi conservate și prin congelare la temperaturi sub 0°. Se inoculează ciupercile pe mediu în eprubete sau, mai bine, în flacoane McCartney. Incubația are loc la temperatura de 20—25° pînă cînd ciuperca a sporulat sau cultura este bine dezvoltată, durata fiind diferită în funcție de grupul sistematic sau chiar de specie. În cazul folosirii flacoanelor se lasă capacele incomplet închise în timpul incubației. Conservarea se face în frigider la —20°. Pentru obținerea unei culturi noi se lasă cultura conservată să se dezgheațe la temperatura camerei și apoi spori sau fragmente de miceliu se transferă pe mediu proaspăt.

Folosind această metodă Carmichael (1956) a reușit să conserve timp de 9 luni 400 culturi aparținînd la 65 genuri, iar în 1962 același autor semnalează păstrarea timp de 1—5 ani a 891 culturi din diferite grupe sistematice, cu o pierdere a viabilității de numai 2,9% din numărul culturilor conservate. Meyer (1955) conservă dermatofiți la —22 sau —52° cu rezultate mai slabe datorită probabil faptului că a repetat dezgheațarea și înghețarea culturilor cu ocazia fiecărei verificări a viabilității. Conservarea diferitelor specii de ciuperci timp de 1—5 ani la —18° a fost semnalată de Kramer & Mix (1957) iar a speciilor de *Penicillium,* timp de un an la —25°, de către Fennell (1960). Trei specii de *Fusarium* au fost păstrate la —18° timp de 2 ani de către Singh (1958) iar Purvis & Barnett (1952) au preparat o suspensie de spori în apă distilată, au înghețat-o și au reușit în acest fel să păstreze 21 de specii de la 5 luni la 2 ani. Dacă accidental frigiderul s-a oprit, culturile

trebuie imediat transferate pe mediu proaspăt, deși multe ciuperci suportă bine congelarea și dezgheţarea repetată. Mazur (1968) tratează pe larg, cu numeroase exemple, problema supravieţuirii ciupercilor, după congelare.

5.1.3. Conservarea sub ulei de parafină

Conservarea sub ulei de parafină se bazează pe reducerea deshidratării și scăderea activităţii metabolice, ciupercile crescînd în condiţiile unui consum redus de oxigen (Fennell, 1960).

În vederea conservării, ciupercile se cultivă în eprubete, pe mediu cu o înclinare mai mică decît în mod obișnuit (fig. 27 B). În acest fel rezultă o suprafaţă mai mică de acoperit și se va folosi o cantitate mai redusă de ulei. În eprubete goale se toarnă ulei de parafină de cea mai bună calitate, purificat, folosit în farmacie, cu greutatea specifică 0,865—0,890. Cantitatea se potrivește în așa fel încît, la turnarea în eprubetele cu culturi, uleiul să depășească cu un cm partea superioară a culturii sau a mediului (Edwards & al., 1947). Eprubetele cu ulei se sterilizează în autoclav timp de 2 ore la 121° și apoi se deshidratează în etuvă la 170° timp de 1—2 ore (Fennell, 1960). În momentul cînd culturile au sporulat sau au ajuns la dezvoltarea optimă, se toarnă uleiul, în condiţii sterile, se acoperă eprubetele cu dopuri de vată și se conservă la temperatura camerei, în camere reci, sau în frigider la 5°.

Transferul ciupercilor păstrate sub ulei nu se poate face fără a transfera și o cantitate oarecare de ulei, care se răspîndește la suprafaţa mediului și, uneori, poate împiedica creșterea noii culturi. Din această cauză deseori este necesar ca ciuperca să fie transferată din nou pentru a elimina uleiul (Dade, 1960).

Metoda conservării sub ulei este simplă, ieftină, transferul se face ușor, este foarte potrivită pentru ciupercile care nu sporulează (Fennell & al., 1950) și pericolul infestării cu acarieni este eliminat (Buell & Weston, 1947). După cîţiva ani de conservare sub ulei unele ciuperci par mai viguroase decît la începutul conservării (Dade, 1960). De asemenea, proprietăţile fiziologice nu sînt afectate. Dezavantajul principal constă în faptul că eprubetele trebuie păstrate în poziţie verticală și riscul contaminării este destul de mare în timpul manipulărilor. Prin această metodă s-au obţinut multe recorduri de longevitate, parte din ele fiind citate de Fennell (1960).

În tabelul 9 sînt cuprinse principalele lucrări în care s-a utilizat conservarea ciupercilor sub ulei de parafină.

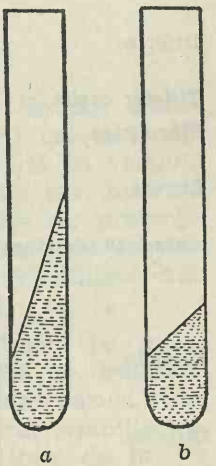


Fig. 27 — Înclinarea mediului în eprubete :
A — pentru culturi obișnuite; *B* — pentru conservarea culturilor sub ulei

Tabelul 9

VIABILITATEA CIUPERCILOR CONSERVATE SUB ULEI

Numele	Nr. specii	Nr. suşe	Condiţii de conservare	Viabilitate		Autorul
				durata	Nr. de specii, suşe, sau %	
Diferite	9	—	t° cam.	1 an		Norris (1944)
Diferite	4	—	„ „	2 ani	4	Wernham (1946)
Diferite	4	—	„ „	4 ani	4	Wernham & Miller (1948)
Phytophthora	—	1	12°	2 ani	1	Wernham & Miller (1948)
Diferite	—	1 800	t° cam.	2 ani		Buell & Weston (1947)
Levuri	—	17	„ „	7 ani	17	Henry (1947)
Diferite	853	1959	15°	2 ani	1950	Stebbins & Robbins (1949)
Saprolegniaceae			4—10°	10—30 luni		Reischer (1949)
Basidiomycetes	3	—	t° cam.	6—14 „		Jaquiot (1951)
„	10	—	„ „	6—7 „		Jaquiot & Leaubie (1952)
Diferite	—	1 244	„ „	12—18 „	96%	Weiss & Oteifa (1953)
Ceratocystis fagacearum	—	15	12°	3 ani	15	Fergus & Cole (1955)
Helminthosporium	32	—	t° cam.	7 ani	16	Cappellini & Haenseler (1958)
Diferite	100	—	„ „	4 ani 8 ani	72 6	Iyengar & al. (1959)
Tilletia caries	—	21	10°	3 1/2 ani	21	Kendrick (1959)
Mucorales	71	199	5—6°	11 ani	79	Hesseltine & al. (1960)
Levuri	13	30	4°	6 ani	22	Novák & Galgóczy (1962)
Helminthosporium	32	—	t° cam.	7 ani 10 ani	16 11	Peterson & Cappellini (1962)
„	32	—	„ „	10 ani 15 ani	21 16	Braverman & Crosier (1966)
Diferite	25	—	„ „	15 ani	22	Gutter & Barkai-Golan (1967)
Diferite	—	202	18—34°	12 ani		Little & Gordon (1967)
Stemphyllium	10	106	t° cam.	5—12 ani	106	Braverman (1970)
Diferite	2	18	2—5°	5—8 ani	6—11	Smith & al. (1970)
Diferite		2 000	t° cam.	10 ani	1955	Onions (1971 a)
Diferite		2 000	„ „	10 ani	699	Simmons (1963)

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.1.4. Conservarea culturilor în sol

Într-o eprubetă se pun 5 g sol de grădină și se sterilizează în autoclav de două ori. După sterilizare solul trebuie să aibă o umiditate de 20%. Dintr-o cultură pe mediu agarizat, sporulată, se prepară o suspensie densă de spori în apă sterilă. Cu un ml apă din această suspensie se inoculează solul și se păstrează 10 zile la temperatura camerei pentru incubare, după care se conservă în frigider (Onions, 1971 a).

Principalul avantaj al acestei metode este faptul că ciupercile își păstrează tipul morfologic normal („wilde type") (Bakerspigel, 1953; 1954; Fennell, 1960) conservîndu-și în același timp și proprietățile fiziologice, iar longevitatea culturilor este mărită. De asemenea, pentru obținerea unei culturi active, este suficient să se însămînțeze cîteva particule de sol pe un mediu proaspăt.

Pe de altă parte, uneori, rezultatele nu sînt satisfăcătoare deoarece în timpul incubației ciupercile au o dezvoltare insuficientă — de obicei sporii doar germinează — și deshidratarea în acest stadiu poate fi fatală. De asemenea, nu se pot face observații în timpul creșterii și eventualele infestări nedorite nu sînt evidențiate decît abia la obținerea culturilor noi.

Diferite specii de ciuperci au fost conservate sub formă de culturi în sol timp de 6 luni pînă la 5½ ani (Nagel, 1938; Miller & al., 1947; Bakerspigel, 1953; 1954). Cormack (1951) a reușit să păstreze culturi de *Fusarium* în sol timp de 3 ani la temperatura laboratorului și 8 ani la 5°. Booth (1971 a) a verificat viabilitatea, apariția mutantelor și păstrarea tipului normal, natural („wild type"), la 800 izolate de la 18 specii de *Fusarium* păstrate 3 ani la temperatura laboratorului și a constatat că speciile testate răspund în mod diferit la conservarea în aceste condiții.

5.1.5. Deshidratarea

Deshidratarea are ca efect întreruperea metabolismului. Se pot deshidrata fie culturile obținute pe medii agarizate fie sporii colectați din aceste culturi. După Fennell (1960) deshidratarea rapidă în vacuum sau în exsicatoare, cu ajutorul unor substanțe chimice, este mai indicată decît deshidratarea lentă la aer. Prezența unor substanțe de protecție sau nutritive are un efect favorabil asupra viabilității, iar prin conservarea la temperaturi scăzute, în frigider, se asigură o viabilitate mai îndelungată decît prin păstrarea la temperatura camerei.

A. Deshidratarea culturilor. Deși în mod obișnuit culturile pe medii agarizate, păstrate vreme îndelungată în atmosferă uscată, se deshidratează și ciupercile nu mai pot fi revitalizate, s-au semnalat cazuri cînd, după un interval destul de lung, culturile și-au păstrat viabilitatea. Fennell (1960) citează numeroase exemple de longevitate de la 2½ la 35 ani.

Roane (1973) introduce o modificare în tehnica de cultivare și obține prelungirea viabilității la culturile de *Pythium* și *Phytophthora* pînă la 2 ani iar la *Diaporthe, Fusarium, Helminthosporium* și *Rhynchosporium* pînă la 15 ani. La suprafața culturilor crescute pe mediu agarizat se pun mărgele de sticlă, semințe mici sau fragmente de lemn, sterilizate. După

ce ciuperca le-a invadat, aceste substraturi sînt transferate în eprubete sterile și sînt supuse unei presiuni negative <100 μmHg, la temperatura camerei, timp de 4 ore, după care eprubeta este închisă și păstrată la 2—5°.

B. Sporii obținuți din culturi se introduc în eprubete în care se află sol sau nisip steril, se amestecă, se deshidratează la 25—30°, apoi se videază eprubeta și se etanșează la flacără (Galloway, 1936). Folosind această metodă Guida & Amaral (1949) au reușit să păstreze viabile timp de 4 ani, la temperatura camerei, conidii de *Aspergillus*, iar Novák & Galgóczy (1962) au conservat la 4°, timp de 6 ani, diferite ciuperci, în special dermatofiți.

C. Deshidratarea sporilor aflați în suspensii elimină congelarea, care are un efect nefavorabil asupra unor ciuperci.

Cu sporii de la o cultură pe mediu agarizat se prepară o suspensie densă în apă sterilă, sau, mai bine, în ser de cal sau soluție 5% de lapte degresat. Suspensia se poate deshidrata ca atare (Rhodes, 1950) ori se îmbibă sau depune pe hîrtie de filtru (Parmentier, 1954; Goldie-Smith, 1956), mărgele de sticlă, aţă, celofan (Fennell, 1960), mărgele de ceramică (Elbakian, 1968, Lange & Boyd, 1968) sau silicagel (Weiss & Hwang, 1955; Onions, 1971 a). Deshidratarea se face la temperatura camerei, în vid, folosindu-se ca agenți chimici P_2O_5, H_2SO_4, $CaCl_2$ sau silicagelul. După deshidratare eprubetele sau flacoanele se închid ermetic și se păstrează la temperatura camerei sau în frigider.

Rhodes (1950) a reușit să conserve 88% din 405 culturi aparținînd la 61 genuri de ciuperci folosind următoarea tehnică : într-un tub de sticlă de 60 × 8 mm, steril, prevăzut cu dop de vată, se pune o cantitate foarte mică de ser de cal sterilizat și în acesta sporii sau fragmente de miceliu. Tubul este introdus într-un tub mai mare care conține, în partea de jos, pentaoxid de fosfor. Se atașează tubul cel mare la o pompă de vid și după deshidratare și vidare se etanșează la flacără.

C. F. Roberts (Onions, 1971 a) folosește următoarea metodă : flacoane McCartney se umplu 3/4 cu silicagel, se sterilizează la 180° timp de 90 minute sau mai mult și se păstrează în atmosferă uscată. Se pun flacoanele pe o baie cu gheață cu 30 minute înainte de introducerea suspensiei. Se prepară o suspensie densă de spori în soluție 5% de lapte degresat, sterilă. Se toarnă suspensia peste silicagel și se păstrează încă 15 minute pe baia de gheață. Silicagelul nu trebuie saturat ci doar umectat în proporție de 3/4 cu suspensie. Se păstrează la temperatura camerei aproximativ o săptămînă pînă cînd cristalele de silicagel se pot separa prin agitare. Se verifică viabilitatea și se închide capacul complet. Flacoanele se conservă în exicator cu silicagel, într-o cameră rece, sau la temperatura camerei.

Lange & Boyd (1968) umplu un flacon McCartney pînă la jumătate cu silicagel cu $CoSO_4$ drept indicator și sterilizează totul în etuvă la căldură uscată. Silicagelul devine albastru. Capacul cu garnitura de cauciuc se sterilizează separat în autoclav. Izolatoare mici de porțelan folosite în electricitate se spală, se sterilizează în etuvă și apoi se transferă într-o eprubetă care conține o suspensie densă de spori în soluție 10% de glutamat de sodiu. După 5 minute tubul este răsturnat astfel încît

sporii neabsorbiţi sînt „filtraţi" prin izolatoare şi dopul de vată. Izolatoarele îmbibate cu suspensie se pun în flaconul McCartney. Prin umidificare stratul superior de silicagel virează în roz dar, dacă mediul este deshidratat, stratul de la bază trebuie să rămînă albastru.

5.1.6. Conservarea în apă distilată

Această metodă a fost descrisă de Castellani în 1939 şi reluată, aproape fără modificări, de acelaşi autor, în 1961, 1962, 1963 şi 1967.
Se cresc culturile pe un mediu favorabil. Sporii sau miceliul se transferă, fără fragmente de mediu, în eprubete de 6—10 ml, care conţin apă distilată, sterilă. Se închid eprubetele cu dopuri de vată sau cauciuc pentru a evita evaporarea. Se păstrează la temperatura camerei (18—22°) şi după un an se transferă pe mediu nutritiv agarizat. După dezvoltarea culturii se prepară din aceasta o nouă „cultură în apă" şi se conservă pentru încă un an.
Castellani a reuşit să conserve prin transferare la un an diferite specii de dermatofiţi. Autorul nu explică mecanismul metodei dar consideră că umiditatea este un factor indispensabil conservării. Deşi ciupercile au o creştere lentă în timpul păstrării, fenomen observat şi de Benedek (1962), nu se produc modificări ale caracterelor morfologice. Probabil succesul acestei metode se bazează pe faptul că ciupercile, în timpul conservării, nu mai sînt în contact cu produşii de catabolizare pe care îi difuzează în mod obişnuit în mediul solid pe care se dezvoltă. Chiar dacă în timpul conservării aceşti produşi se mai elimină în apă, cantitatea este prea mică şi diluată pentru a provoca inactivarea ciupercilor.
Benedek (1962) foloseşte în loc de apă distilată ser fiziologic şi conservă culturile în flacoane McCartney la 5°, în frigider, iar Tachibana (1962) păstrează în aceleaşi condiţii, timp de 8 luni, culturi de *Urocystis tritici*.
Eficienţa metodei a fost confirmată de Benedek (1962), Latourelle & al. (1966) şi Baldasserini & Mungelluzzi (1965). Jover & Perez (1967) au reuşit să conserve timp de 2 ani 71% din 52 suşe de dermatofiţi. Al-Doory (1968) semnalează păstrarea timp de 3 ani, a 55 suşe de dermatofiţi aparţinînd la 20 specii, pe fire de păr suspendate în apă distilată, sterilă. În absenţa părului ciupercile n-au supravieţuit aceeaşi perioadă. Dick (1965) folosind flacoane cu apă distilată în care suspendă seminţe de cînepă şi un fragment de culturi reuşeşte să conserve la 20° timp de 15 luni şi la 5° timp de 2—3 ani, diferite specii de *Saprolegniaceae*.
Folosind metoda lui Castellani, Figueiredo (1967) a conservat ciuperci fitopatogene timp de 14—18 luni.

5.1.7. Liofilizarea

Liofilizarea constă în deshidratarea prin îngheţare şi sublimare la presiune redusă a culturilor sau a suspensiilor de spori. Prin această deshidratare rapidă se evită concentrarea sărurilor şi a substanţelor de dezasimilaţie care, în cazul unei evaporări lente, devin toxice pentru microorganismele aflate în suspensie.

Liofilizarea a fost aplicată prima oară la ciuperci de Raper & Alexander (1945). Fennell (1960), Tuite (1969) și Onions (1971a) tratează aproape toate aspectele aplicării acestei metode la conservarea ciupercilor. Deoarece principiile și tehnica de liofilizare sînt descrise pe larg, în limba română, de Negruțiu & al. (1962) în cele ce urmează vor fi enumerate doar etapele principale ale aplicării acestui procedeu la ciuperci. Detaliile de tehnică depind în mare măsură de tipul aparatului care se folosește și sînt descrise în instrucțiunile care însoțesc aparatele.

Dintr-o cultură sporulată, „matură", dar nu îmbătrînită, se prepară o suspensie densă de spori într-un lichid sau mediu de protecție.

Lichidele de protecție utilizate mai frecvent sînt următoarele : soluții de sucroză sau glucoză 20% (Blackwood, 1955 ; Haskins & Anastasiou, 1953), zaharoză (Akai & Asada, 1961), ser de bou nediluat etc. Cel mai bun este însă laptele degresat (Onions, 1971a). Pentru *Pythium* singurul mediu de protecție s-a dovedit țesutul vegetal (Staffeldt & Sharp, 1954) iar Sharp & Smith (1952 a ; 1957) au liofilizat uredospori de *Puccinia graminis* în absența totală a lichidului de protecție. De asemenea, porțiuni din culturi ca și microculturile pot fi liofilizate fără lichide de protecție.

Soluția de lapte degresat, preparată eventual din lapte praf, se sterilizează în cantități mici în eprubete. Cu o pipetă Pasteur, se introduc cîte 0,05—0,1 ml suspensie de spori în 6 tuburi din sticlă Pyrex de 100 × 6 mm, sterilizate, prevăzute cu dopuri de vată. După R. J. Heckly (citat de Tuite, 1969) capacitatea tubului trebuie să fie de 10 ori cît volumul suspensiei. Tuburile se marchează în prealabil sau în ele se introduce, înainte de sterilizare, o bandă de hîrtie care poartă codul sau numărul culturii. După introducerea suspensiei care va îmbiba hîrtia se pune dopul, vata rămasă în afară se arde la flacără și apoi dopul se împinge pînă la 3—4 cm distanță de capătul închis. Toate aceste operații se fac în condiții de sterilitate.

Se atașează tuburile la racordurile de cauciuc ale aparatului de liofilizat și apoi se cufundă în soluția de congelare. Soluțiile de congelare sînt formate din amestec de zăpadă carbonică — acetonă, zăpadă carbonică — alcool 95%, acetat de etil etc., care asigură o temperatură de aproximativ —35°. Unele aparate sînt prevăzute cu congelatoare electromecanice. Prin acest procedeu suspensia de spori este înghețată instantaneu. Weiss (1957) pune tuburile după congelare într-un recipient de evacuare și, după deshidratare, vacuum-ul este întrerupt și tubul se introduce în alt tub mai mare care este la rîndul său atașat liofilizatorului, supus vidului și etanșat. Prin această tehnică a „tubului dublu" se evită pericolul contaminării în timpul deschiderii tubului, la revitalizarea ciupercii liofilizate.

Se pornește pompa de vid, se aduce temperatura băii de răcire la —10...—0° și se începe evacuarea care durează 1 — 1½ oră. După Haskins (1957) nu este necesară înghețarea la temperaturi foarte joase ci doar solidificarea suspensiei. Între tuburile puse la liofilizat și pompa de vid sînt intercalate două dispozitive sau camere de condensare a vaporilor de apă astfel încît aceștia nu ajung la pompă. Răcirea acestor camere de eliminare a vaporilor se realizează cu diferite soluții care asigură o temperatură de —55 pînă la —196°.

Cînd preparatul este uscat conținutul tubului apare ca un praf alb. În acest moment se ridică tuburile din baia de răcire și se continuă evacuarea timp de 30—45 minute la temperatura mediului ambiant, la un vacuum de 200—500 μm Hg.

Tuburile se închid la flacără, cu un arzător în cruce, în timp ce sînt încă atașate la liofilizator. Un alt procedeu constă în umplerea tuburilor, după deshidratare, cu azot steril și apoi etanșarea lor.

A doua zi se verifică fiecare tub cu un indicator de vid de înaltă frecvență care, dacă vidul este sub 1 Torr, provoacă prin inducție iluminarea în violet a gazelor rarefiate din interiorul tubului. Măsurarea vidului se poate face și cu ultravacuummetru (Negruțiu & al., 1962). Tot a doua zi după liofilizare se verifică și viabilitatea ciupercii. Se sterilizează tubul la suprafață cu alcool, se taie cu un cuțit pentru sticlă, se învelește în tifon dublu, sterilizat și se deschide prin rupere ca în cazul fiolelor cu medicamente. Se adaugă o cantitate de apă sterilă egală cu cea eliminată prin deshidratare, se lasă 20—30 minute pentru ca lichidul să fie absorbit de material și apoi se însămînțează pe mediu. Menținerea materialului în atmosferă umedă, timp de cîteva ore după deschiderea tubului, are un efect favorabil asupra revitalizării ciupercii (Haskins, 1957). Kondo (1961) a remarcat că germinarea sporilor de *Ustilago avenae* a fost mai bună după un an de păstrare la 5 sau —15° decît imediat după liofilizare.

Conservarea ciupercilor liofilizate se poate face în întuneric, la temperatura camerei, dar mai bine în camere reci (15—17°) sau frigider la 5—8°. Temperaturile scăzute sînt indicate în special pentru tuburile în care există un procent mai ridicat de umiditate reziduală. Tuburile se atașează cu bandă adezivă pe cartoane care poartă numele și numărul ciupercii. Acestea se pun în plicuri sau pungi din polietilenă și se păstrează în dulapuri cu sertare fiind aranjate alfabetic similar fișelor, sau în frigider.

Avantajele liofilizării constau în aceea că, eliminînd transferările repetate, variabilitatea este redusă, izolatele păstrîndu-și caracterele morfologice și proprietățile biochimice. Viabilitatea este mult prelungită iar culturile noi se dezvoltă chiar din sporii care au fost conservați. Riscul contaminării în timpul conservării este exclus iar spațiul necesar pentru depozitare este minim. Principalul dezavantaj al metodei este acela că o cultură nu se poate folosi decît o singură dată. Acest neajuns poate fi eliminat dacă se utilizează metoda culturilor stoc „seed stock" (Clark & Loegering, 1967) care constă în următoarele: tuburi sau fiole din cultura originară, liofilizată, se păstrează în condiții optime ca o colecție de rezervă care nu se distribuie în mod obișnuit. Din timp în timp un tub din această colecție stoc se deschide și cultura obținută este din nou liofilizată pentru distribuire, sau se prepară o nouă serie de culturi stoc, dacă cea veche este aproape epuizată. În acest fel cultura originară este conservată timp îndelungat.

Liofilizarea a fost folosită pentru conservarea ciupercilor din toate grupele sistematice. Relativ recent a fost aplicată la *Myxomycetes* (Davis, 1965; Kerr, 1966) și chiar la ciupercile sterile, nesporulate (Last & al., 1969). Fennell (1960), Clark & Loegering (1967) și Mazur (1968) citează numeroase exemple de aplicare a acestui pro-

cedeu la ciuperci. În tabelul 10 sînt incluse date privitoare la durata conservării, prin liofilizare, atît a ciupercilor cultivate pe medii, cît și a sporilor ciupercilor parazite pe plante.

Tabelul 10

VIABILITATEA CIUPERCILOR CONSERVATE PRIN LIOFILIZARE

Numele	Nr.	Viabilitate	Autorul
		Din culturi	
Diferite	2700 izolate	2 ani	Buell & Weston (1947)
Diferite	23 „	7 ani	Fennell & al. (1950)
Mucorales	245 „	2½ ani	Fennell & al. (1950)
Aspergillus	78 specii	15 ani	Mehrotra & Hesseltine (1958)
Penicillium	140 specii	15 ani	Mehrotra & Hesseltine (1958)
Diferite	363 izolate	8—17 ani	Hesseltine & al. (1960)
Pythium	—	5—7 ani	Staffeldt (1961)
Aspergillus, Penicillium + alte	447 izolate	23 ani	Ellis & Roberson (1968)
Diferite		20 ani	Rhoades (1970)
Levuri	9 genuri	6 ani	Antheunisse (1973)
Diferite	5 genuri	6 ani	Antheunisse (1973)
		Pe plante	
Puccinia graminis (uredospori)		82—309 zile	Sharp & Smith (1952a)
Puccinia coronata (uredospori)		81—529 „	Sharp & Smith (1952a)
Puccinia coronata (uredospori)		2 ani	Sharp & Smith (1952b)
Puccinia graminis (uredospori)		5½ ani	Sharp & Smith (1957)
Puccinia graminis (uredospori)		300 zile	Stewart (1956)
Puccinia striiformis (uredospori)		5½ ani	Hughes & Macer (1964)
Cronartium fusiforme (ecidiospori)		1½ ani	Roncadori & Matthews (1966)

5.1.8. Conservarea în azot lichid

Azotul lichid a fost folosit prima dată pentru conservarea ciupercilor de Hwang (1960), ca metodă complementară pentru speciile care nu suportă liofilizarea. Prin răcire la temperaturi mai joase de —130° metabolismul ciupercilor este întrerupt și deci, cele care rezistă la înghețare și dezgheță în vederea reactivării, pot fi conservate timp nelimitat, fără a suferi modificări (Hwang, 1960; Onions, 1971a). Efectele temperaturilor

scăzute asupra ciupercilor sînt discutate pe larg de Fennell (1960) iar diferite aspecte ale crioconservării sînt tratate de Cowley & Rinfert (1963), Mazur (1963), Moline & al. (1963), Goos & al. (1967), Bugbee & Kernkamp (1966), Mazur & Schmidt (1968) și Mazur (1968).

Următoarea tehnică este o sintetizare a celei utilizate și descrise de Hwang (1960 ; 1966), Loegering & al. (1966) și Onions (1971 a) : Se confecționează fiole din sticlă cu borosilicați : Din tuburi cu diametrul interior de 3 mm și cel exterior de 5 mm, se taie cu un cuțit pentru sticlă bucăți de 10 cm lungime. Fiecare tub obținut se taie în două cu un arzător special cu 3 duze, care este folosit în mod obișnuit pentru închiderea fiolelor, realizîndu-se astfel două tuburi de 5 cm lungime avînd fiecare cîte un capăt închis. Se mai pot utiliza și tuburi gata fabricate cu capacitate de 1,2 ml „Wheaton Goldband" produse de T.C. Wheaton Co, Millville, N.J., sau altele similare. Fiolele sau tuburile se închid cu dopuri de vată și se sterilizează. Tuite (1968) înlocuiește fiolele de sticlă cu plicuri cu dimensiunile de 9 × 3,5 cm confecționate din folii de poliester, prevăzute cu 4 compartimente în care introduce materialul și care se pot etanșa prin topire. Aceste containere nu se fisurează, deci pericolul de explozie este exclus și ocupă mai puțin spațiu. Pe de altă parte la —196° poliesterul este destul de fragil și trebuie manipulat cu grijă.

Cînd suspensia se prepară din culturi se introduce în eprubetă o cantitate mică de soluție de glicerină 10% în apă distilată sau soluție 10% dimetilsulfoxid, sterilizate în autoclav. Aceasta din urmă este mai potrivită pentru unele ciuperci (Hwang & Howells, 1968). Cu o microspatulă sau ac de însămînțat se răzuie suprafața culturii pînă se obține o suspensie densă de spori sau miceliu. Cîte 0,2—0,5 ml din această suspensie, sau discuri din culturi, ori semințe, se introduc în fiole și apoi se etanșează fiolele la flacără folosind același arzător. După Davis & al. (1966) uredosporii de *Puccinia graminis* suportă mai bine conservarea dacă sînt uscați și nu în soluție de protecție. Dacă se folosesc fiole speciale gata fabricate acestea se pot închide la flacără cu un aparat semiautomat.

După etanșare fiolele se marchează, cele gata fabricate cu un dispozitiv special iar pe cele confecționate în laborator se lipește o bandă îngustă de leucoplast pe care sînt notate, cu o cerneală rezistentă, datele necesare pentru identificare.

Etanșeitatea fiolelor se verifică cufundîndu-le timp de 30 minute într-o soluție de colorant (albastru de metilen) la 4°, care va pătrunde în cele fisurate.

Fiolele se introduc apoi în suporturi din aluminiu de forma unor semicilindri în care încap, puse cap la cap, 6 fiole. Aceste suporturi se pun, cîte 20, în cutii de aluminiu perforate, iar cutiile în recipientele pentru conservare.

Răcirea fiolelor se face lent, gradat, de la temperatura ambiantă pînă la —35°, cîte un grad pe minut. Pentru aceasta este nevoie de aparate speciale. După atingerea acestei temperaturi se pot cufunda brusc în recipientele cu azot lichid în care temperatura variază de la aproximativ —150° la suprafață, în vapori, pînă la —196 în azotul lichid.

Deoarece regăsirea unei fiole în recipient este foarte anevoioasă se folosesc diferite sisteme de compartimentare și marcare a recipientului iar

la cutiile de aluminiu se ataşează etichete care rămîn în afara recipientului.

La cîteva zile după introducerea în azot lichid o fiolă de la fiecare izolat, mai ales dacă este vorba de o specie care n-a mai fost conservată în acest fel, se dezgheaţă pentru verificarea viabilităţii.

Dezgheţarea fiolelor trebuie făcută brusc, prin transferare din azot într-o baie de apă cu temperatura de 38°, unde se rotesc şi, în 30—40 secunde, orice urmă de gheaţă dispare. După dezgheţare fiolele se sterilizează la suprafaţă cu alcool, se deschid şi se dispersează conţinutul pe mediul dintr-un vas Petri.

Precauţii: Azotul nu este toxic dar dacă încăperea în care sînt depozitate recipientele nu este aerisită concentraţia de azot poate creşte şi provoca sufocarea celor care lucrează în ea. Camera trebuie să fie ventilată prin deschiderea uşii sau ferestrelor ori prin alt sistem. Se va evita contactul direct cu azotul lichid, sau chiar cu recipientele răcite în care este depozitat, prin folosirea mănuşilor de azbest. Pentru înlăturarea pericolului de explozie, în afara controlului etanşeităţii fiolelor în colorant, la introducerea în azot se vor ţine fiolele, pentru un moment, în vaporii de la suprafaţa lichidului. La scoaterea din recipient a fiolelor se va purta o mască de protecţie din material plastic iar transferul în baia de apă se va face cît mai rapid deoarece în baie, în caz de explozie, particulele de sticlă nu sînt aruncate în afară. Pentru mai multă siguranţă baia trebuie totuşi prevăzută cu un ecran de protecţie, transparent.

Avantajul principal al acestei metode este acela că ciupercile conservate în azot lichid îşi păstrează neschimbate caracteristicile pe care le-au avut în momentul începerii conservării. Nu apar mutaţii (Wellman, 1967), patogenitatea (Loegering & al. 1966; Hwang & al., 1968)

Tabelul 11

VIABILITATEA CIUPERCILOR CONSERVATE ÎN AZOT LICHID

Numele	Nr. izolate sau specii	Viabilitate	Autorul
Diferite	162 izolate	6—57 luni	Hwang (1966)
Diferite	104 izolate	18 luni	Hwang (1968)
Diferite	14 specii	17 luni	Kilpatrick & Mobley (1967)
Agaricus bisporus (miceliu)		2½—6 luni	San Antonio & Hwang (1970)
Septoria passerini		12 luni	Anderson & Skovmand (1971)
Peronospora tabacina (sporangi)		2 ani	Bromfield & Schmitt (1967)
Puccinia graminis (picnospori)		1 an	Bugbee & Kernkamp (1966)
Puccinia graminis (uredospori)		1—5 ani	Loegering & al. (1966)
Puccinia graminis (uredospori)		10 ani	Kilpatrick & al. (1971)

și producția (San Antonio & Hwang 1970) nu sînt afectate. Se pot conserva și ciuperci care nu sporulează sau cele care nu cresc pe medii. Dezavantajele privesc costul relativ ridicat al aparaturii pentru răcire treptată și necesitatea unei surse permanente de azot lichid. După Onions (1971a) metoda este convenabilă pentru colecțiile mari.
Deoarece folosirea azotului lichid pentru conservarea ciupercilor este de dată relativ recentă „recordurile" înregistrate nu sînt așa de mari. În tabelul 11 sînt cuprinse date referitoare la conservarea prin această metodă a ciupercilor cultivate pe medii sau a sporilor colectați de pe plante (vezi și Clark & Loegering, 1967 și Mazur, 1968).

5.1.9. Protecția culturilor

Principalul pericol al culturilor de ciuperci, în special a celor conservate prin metoda transferului periodic, este constituit de acarieni și, în mai mică măsură, de mucegaiurile care infestează dopurile sau capacele flacoanelor în care se păstrează culturile. Acarienii care infestează de obicei culturile fac parte din genurile *Tyroglyphus* și *Tarsonemus* și se află în mod obișnuit pe materialele organice (plante, semințe, făină, brînză) în praf și în particulele de sol (Booth, 1971b). Acarienii se hrănesc cu sporii unor ciuperci, se deplasează prin vasele Petri sau eprubete străbătînd chiar dopurile de vată și distrugînd sau contaminînd culturile cu alte specii de ciuperci sau cu bacterii.

A. **Măsuri preventive.** Evitarea prelucrării materialelor organice în încăperea unde se țin culturile.
Păstrarea curățeniei laboratorului și a dulapurilor sau stelajelor pe care se depozitează culturile și dezinfectarea cu formalină sau cloramină (Popov, 1966) sau petrol (Arêa Leão & al., 1945). Prezența unor substanțe ca paradiclorbenzenul sau camforul îndepărtează acarienii și insectele.
Eliminarea oricărei culturi noi, contaminate. La C.B.S.-Baarn culturile primite pentru colecție, dacă sînt contaminate cu acarieni, se sterilizează imediat în autoclav (Anonim, 1972).
Folosirea unor bariere ca apa (Barnes, 1933) sau cleiul (Duché, 1933) nu asigură protecție eficace.
Păstrarea culturilor în frigider. Deși la temperatura de 5° acarienii nu sînt omorîți ei sînt imobilizați, nu pot contamina alte culturi și nu se pot înmulți (Smith, 1967).
Culturile conservate sub ulei de parafină sînt protejate de infestare cu acarieni (Booth, 1971b).
Folosirea foiței pentru țigări (Snyder & Hansen, 1946). Se prepară o soluție de gelatină 20% în apă la care se adaugă 2% sulfat de cupru. Aproximativ 25 ml din soluție se toarnă într-un vas Petri și se lasă să se răcească. Se taie foițele în două și, eventual, se pot steriliza în etuvă sau cu oxid de propilen. După ce culturile au fost inoculate se pune dopul, se arde vata rămasă în afară și dopul se împinge sub nivelul deschiderii eprubetei. Se încălzește la flacără gîtul eprubetei, se presează deasupra gelatinei și apoi, imediat, peste foiță. Foița aderă și după ce se acoperă în acest fel o serie de eprubete se flambează foița care depășește gîtul eprubetei. După Booth (1971b) această metodă, folosită la C.M.I.-Kew, este cea mai bună și doar aparent laborioasă.

Carpenter (1914) a propus tratarea dopurilor cu soluția: 95 ml alcool 95%, 0,5 g $HgCl_2$, 5 ml glicerină, la care se adaugă un colorant solubil în alcool pentru ca dopurile tratate să poată fi deosebite de cele netratate. Raper & Fennell (1965) recomandă ca umectarea dopurilor să se facă după ce s-au dezvoltat colonii tipice dar, după cîțiva ani de folosire în mod curent a acestei tehnici, nu am observat nici un efect nefavorabil atunci cînd tratamentul s-a făcut imediat după inoculare. Soluția se păstrează în sticle cu tub picător. Se pipetează soluția pe dop, la locul de contact cu marginea eprubetei. Această soluție are și efect fungistatic împiedicînd dezvoltarea ciupercilor contaminante pe dopurile de vată, fenomen frecvent cînd culturile sînt conservate în atmosferă umedă. Este recomandată de mulți autori și se folosește curent în multe colecții de culturi.

B. **Măsurile curative** se bazează pe proprietățile acaricide ale unor substanțe volatile. S-au utilizat multe produse dar, chiar dacă unele dintre ele sînt eficace în combaterea acarienilor, mirosul, inflamabilitatea, efectele toxice asupra celor care lucrează sau asupra ciupercilor a dus la abandonarea lor.

Umectarea dopurilor de vată cu cîteva picături de lichid acaricid poate inactiva acarienii prezenți în culturi. Puntoni (1931) și Emmons (1939) au folosit benzina, Arêa Leão & al. (1945) petrolul, Dayal & al., (1964) lindanul iar Smith (1967), încercînd mai multe substanțe, obține cele mai bune rezultate cu „Kelthane", care conține 1,8% di-(p-p-clorfenil) triclormetil carbinol sau „Cypro" care este compus din 1,18% piretrină și 11,87% butoxid de piperonil.

Gazarea eprubetelor este un alt mijloc eficace. Aceasta se realizează într-un recipient închis în care eprubetele sau vasele Petri sînt supuse acțiunii vaporilor. Crowell (1941) a obținut rezultate bune prin folosirea „Dicloricidului" timp de o oră iar Benedek (1963) a utilizat timolul fără a specifica însă durata tratamentului.

5.2. Conservarea ciupercilor ca materiale de herbar

5.2.1. Herbarul micologic

În micologie, ca și în alte științe, una din problemele principale este de a avea obiectul de studiu (organismul fungic) într-o formă accesibilă. Acest lucru se realizează, în afara colecțiilor vii, prin conservarea materialelor în herbare. Herbarul este o sursă primară de informații spre deosebire de literatură care este una secundară. După cum remarcă Fosberg (1946) „Conservarea materialului eliberează știința, în mare măsură, de tirania cuvintelor și a erorilor care se produc în menționarea, folosirea și interpretarea lor". O colecție este, după Smith (1966) „O documentație absolut esențială pentru concepțiile generale ale biologiei fundamentale care cer verificarea și reverificarea cu obiectele reale, tangibile, materiale, nu cu ceea ce cineva a spus sau a scris despre aceste obiecte". În sfîrșit, Shetler (1969) arată că „Adevărata valoare a unui herbar pentru știință și societate, în sensul cel mai exact, este incalculabilă". Pentru o introducere în problemele generale ale colecțiilor de herbar este indicată consultarea lucrărilor lui Beaman (1965), Rol-

lins (1965), Smith (1966), Shetler (1969) și Constantinescu (1972), iar pentru aspectele tehnice și organizatorice lucrarea lui Fosberg & Sachet (1965) este esențială. Detalii privind în mod special herbarele micologice sînt date de Ellis (1960), Savile (1962) și Ziller & Lowe (1968).
Metodele și tehnicile de lucru utilizate în herbarele micologice nu se deosebesc esențial de cele folosite în celelalte herbare.

A. **Construcția.** Herbarele se pot instala în clădiri vechi sau în construcții noi, special prevăzute pentru această destinație. „O construcție pentru herbar este o investiție pe termen lung și o clădire prost construită este o falsă economie" (Fosberg & Sachet, 1965). Condițiile minime necesare sînt următoarele : încăperile de depozitare să fie amplasate la un nivel care exclude pericolul de inundație și să fie protejate împotriva infiltrațiilor de apă sau a focului. Camerele nu trebuie să fie prea înalte — deoarece dulapurile de herbar nu depășesc 2,10 m înălțime — să poată fi aerisite ușor și protejate împotriva prafului sau a variațiilor mari de temperatură. O condiție importantă este prevederea, în cazul construcțiilor noi, de spații suplimentare pentru mărirea colecțiilor, știut fiind faptul că extinderile ulterioare ale clădirilor sînt mult mai costisitoare. În imediata apropiere a încăperilor pentru depozitare trebuie să fie amplasate camerele pentru condiționarea, uscarea și dezinsectizarea materialelor, precum și laboratoarele cercetătorilor și biblioteca.

B. **Mobilier și materiale.** Dulapurile trebuie să fie în primul rînd funcționale adică să asigure depozitarea în condiții optime a unei cantități cît mai mari de material. Cele mai bune sînt dulapurile confecționate din tablă de oțel, ca cel din figura 28 produs de firma „Lane Sci. Equipment Co." N.Y., U.S.A., sau din lemn, cu dimensiuni exterioare de aproximativ 210 × 75 × 50 cm, cu uși care se închid ermetic, se pot încuia și se pot scoate la nevoie cu ușurință (lucru necesar cînd se fac schimbări importante în colecție). Dulapul este împărțit în 26 despărțituri și fiecare compartiment are dimensiunile interioare de 42,5 × 31 × 15 cm. Între marginea anterioară a rafturilor și ușă trebuie să rămînă un spațiu de 1 cm, cînd ușa este închisă, pentru a asigura difuzarea insecticidelor în toate compartimentele. Pentru evitarea deteriorării materialului este foarte important ca suprafețele interioare ale despărțiturilor să fie perfect netede.
Alte piese principale ale mobilierului pentru herbar sînt dulapurile pentru fișele de evidență și cele pentru colecțiile de preparate.

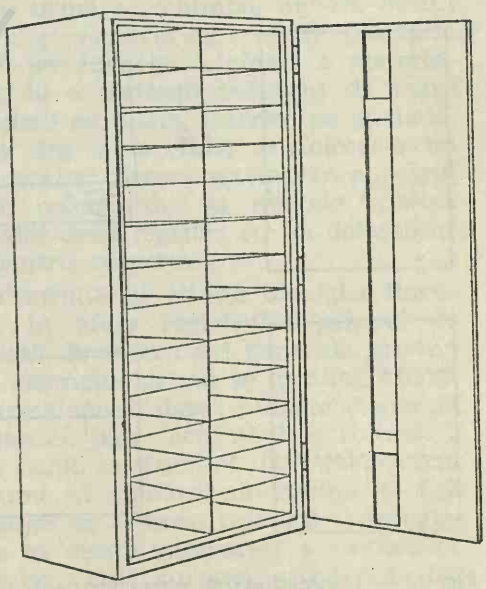


Fig. 28 — Dulap pentru herbar (după prospectul firmei „Lane")

În afara lupelor binocular cu braț lung, mașini de scris și cuțite pentru tăiat hîrtie etc., sînt necesare unele materiale specifice de herbar :

— Coli de herbar cu dimensiuni de 29 × 42 cm din carton subțire „bristol" și mape pentru specii, confecționate din hîrtie mai groasă, de cea mai bună calitate. Mapele, îndoite, au dimensiunile de 42,5 × 30 cm. Bare & Bare (1971) descriu un dispozitiv cu ajutorul căruia se poate obține o pliere dublă a mapelor, foarte practică și necesară în cazul includerii în mapă a unui număr mare de coli.

— Plicurile de herbar constituie materialul cel mai important și cel mai folosit într-un herbar micologic și de aceea trebuie confecționate numai din hîrtie fabricată 100% din deșeuri de bumbac. Plicurile (fig. 29) pot fi confecționate cu mașina (fig. 29 *A*) sau manual (fig. 29 *B, C*) și au dimensiunile de 15 × 10 ; 12,5 × 7,5 ; 22 × 8 cm sau altele. Plicuri similare cu cel din figura 29 *B*, cu dimensiuni de 15 × 10,5 și 18 × 8,5 cm, se confecționează manual în herbarul BUCM, cu un dispozitiv din plexiglas inspirat de cel descris de Smith (1940). O condiție esențială este ca plicul, lipit pe coala de herbar, să poată fi deschis cu ușurință fără a se îndoi conținutul. Dacă partea din față este destul de mare (fig. 29 *A, B*) atunci datele se înscriu pe această suprafață și nu mai este necesară lipirea unei etichete. Pentru unele ciuperci fragile sau de dimensiuni mici, ori la cele la care sporii constituie o masă prăfoasă, așa cum sînt *Ustilaginalele*, este indicat ca materialul să fie introdus într-un plic din celofan sau pergament subțire și apoi în plicul de hîrtie. Ouellette & al. (1966) au propus folosirea unor plicuri din carton, în care se pot păstra și exemplare mai voluminoase, iar plicurile se depozitează vertical, ca fișele, fără a fi lipite pe coli.

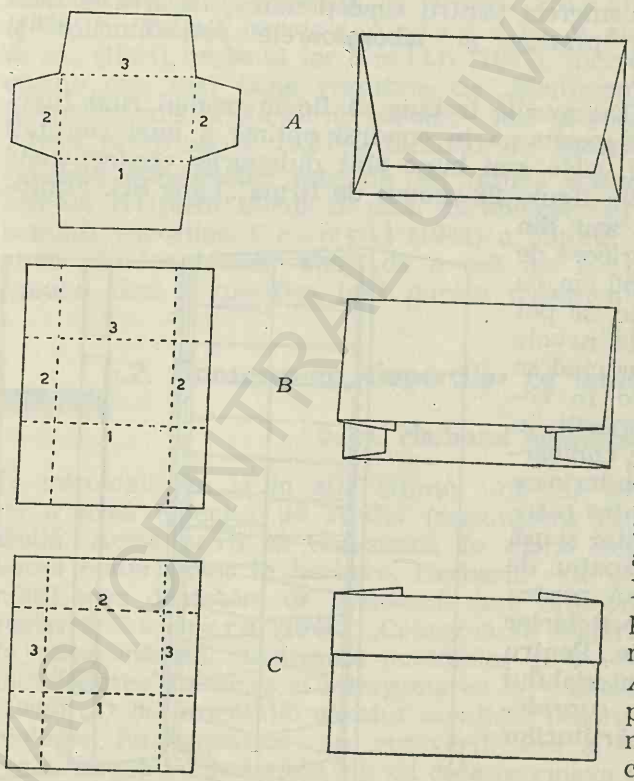


Fig. 29 — Confecționarea plicurilor pentru herbar : *A* — mecanic ; *B* și *C* — manual. Cifrele reprezintă ordinea plierii hîrtiei

Pentru ciupercile cu corpuri fructifere voluminoase *(Aphyllophorales, Agaricales)* se folosesc plicuri de dimensiuni mari, pungi de hîrtie sau cutii, iar pentru cele fragile și mici *(Myxomycetes)* se utilizează cutii din carton, de diferite dimensiuni, în care exem-

plarele se păstrează în vată. În toate aceste cazuri, pungile, plicurile sau cutiile se aranjează în cutii de carton de 42 × 30 × 14 cm care se introduc în compartimentele dulapurilor.

— Etichetele (vezi pag. 7 fig. 1) se confecționează din hîrtie albă și ele trebuie să fie marcate prin tipărire sau ștampilare cu codul herbarului. Completarea etichetelor se face la mașina de scris prevăzută cu panglică neagră de calitate superioară sau cu cerneală neagră, persistentă, ori tuș.

Deoarece în general în herbare se depozitează materiale micologice prelucrate și identificate vom descrie operațiile principale care se execută și anume : înregistrarea în sistemele de evidență, dezinsectizarea și introducerea în colecție. Prelucrarea și condiționarea ciupercilor în vederea includerii în herbar au fost descrise în capitolul 1.

C. **Evidența materialelor depozitate.** Herbarul fiind o sursă de informații toate datele incluse trebuie înregistrate într-un sistem care să reflecte conținutul colecției și să permită regăsirea rapidă a materialelor.

Deoarece majoritate ciupercilor conservate în herbare sînt parazite pe plante, care reprezintă o sursă importantă de informații pentru identificare, modul de evidență în herbarele micologice este diferit și mai complex decît în herbarele de fanerogame.

La primirea materialelor se înregistrează într-un caiet sau registru, data, numele expeditorului, conținutul trimiterii (grupul sistematic sau numele speciei), numărul de exemplare și numerele de colecție pe care exemplarele le vor primi. Acestea din urmă se completează după numerotarea exemplarelor. Se va specifica de asemenea numărul scrisorii care a însoțit materialul și dacă a avut anexate liste, cataloage, schedae etc. Imediat după primire fiecare exemplar va fi marcat prin ștampilare cu codul herbarului (cel înscris în Index herbariorum) și nu cu antetul instituției deoarece numele acesteia din urmă se schimbă, uneori, destul de des. O dată cu marcarea se va înscrie și numărul de colecție. Ștampila și numărul nu se vor aplica niciodată pe eticheta originală a materialelor ci pe plic sau coala de herbar, la o distanță suficient de mare pentru ca aceste date să nu fie confundate cu altele, înscrise pe etichetă. La herbarul Institutului de micologie din Kew (IMI) se folosește un registru de primire în care se trece pentru fiecare exemplar numărul de colecție, țara de origine, numele colectorului și numele speciei. Fiecare exemplar mai este indexat în alte două registre cu foi detașabile, unul pentru plantele gazdă și altul pentru ciuperci.

La herbarul micologic (BUCM) al Institutului de științe biologice-București se folosește următorul sistem : în afara registrului general de primire — care servește doar ca o sursă de informații generale privind influxul de material — pentru fiecare exemplar primit se dactilografiază, în trei exemplare, fișe care cuprind următoarele date : numele ciupercii, numărul de colecție primit, numele gazdei, țara, locul și data colectării, numele colectorului și, acolo unde este cazul, se specifică dacă exemplarul face parte dintr-o exsiccată, care anume și numărul de ordine. O fișă este introdusă în fișierul numeric aranjat în ordinea primirii și înregistrării exemplarelor în colecție, o alta în ordine alfabetică a ciupercilor și a treia în ordine alfabetică a plantelor gazdă. Cu ocazia fișării se fac și corectări de nomenclatură a ciupercilor și plantelor gazdă, trecerea formelor neperfecte la formele perfecte etc., toate modificările fiind

înscrise pe fișă sau pe fișe suplimentare, întregul fișier funcționînd, în final, ca un „cross-index". Această lucrare este laborioasă, nu poate fi executată decît de personal științific calificat, dar permite o evidență precisă a materialelor incluse, eliminînd consultarea prea frecventă a materialelor. Totodată este o etapă obligatorie pentru trecerea la un sistem de evidență automatizat al informațiilor depozitate în herbare, problemă foarte actuală în activitatea colecțiilor de acest fel (Soper & Perring, 1967; Beschel & Soper 1970; Argus & Sheard, 1972; Greene, 1972; Hall, 1972, 1974; Brenan, 1974; Morse, 1974). Este bine să fie ținută la zi o evidență, pe fișe, a diferitelor colecții incluse în herbar cum ar fi unele exsiccate, colecții din diferite țări sau ale anumitor colectori, dublete de la diferite herbare și, în general, orice material care a fost distribuit sub formă de colecție numerotată. O astfel de evidență, extrem de utilă pentru evitarea unor dubluri, mai ales în cazul achiziționării de noi materiale, există la herbarul BUCM.

În cazul cînd se face un schimb frecvent de material cu unele instituții este bine de păstrat o evidență pe fișe din care, în orice moment, se poate verifica balanța de schimb cu fiecare partener în parte.

Un registru special trebuie întocmit pentru exemplarele care au fost împrumutate altor colecții pentru studii. Acesta trebuie să cuprindă numele instituției solicitante, numărul scrisorii, numele și numărul de colecție al exemplarului sau exemplarelor împrumutate, data expedierii și data înapoierii materialului.

Într-un alt registru se vor consemna date referitoare la vizite sau consultări ale materialelor de către specialiști. Se notează data, numele persoanei, instituția, specia sau grupul consultat.

D. **Dezinsectizarea.** Inamicii principali ai colecțiilor de herbar sînt insectele, care se hrănesc cu plantele, sau care devorează cleiul folosit la lipirea etichetelor. Cele mai cunoscute specii sînt următoarele : *Lasioderma serricorne, Anthrencis scorphulariae, Sterrha bonifata, Sterrha inquinata, Ephistia cautella, Anagasta kühniella, Lyposcelis* sp. și *Lepisma saccharina.*

Combaterea se face mai ales prin măsuri preventive care constau în dezinsectizarea dulapurilor noi înainte de a se introduce plantele, păstrarea curățeniei, interzicerea consumării alimentelor în herbar, dezinsectizarea tuturor materialelor care se introduc în herbar, inclusiv a celor care au fost scoase provizoriu pentru studiu, deschiderea dulapurilor doar cît este necesar pentru introdus sau scos materiale etc. Dacă materialele care se introduc în herbar sînt gazate cu grijă, herbarul este păstrat curat și dulapurile închise, nu este necesar ca insecticidele să se afle permanent în aceste spații (Lellinger, 1972).

Dezinsectizarea se poate face prin gazare sau fumigare, tratament termic și otrăvirea plantelor.

Gazarea sau fumigarea. Pentru dezinsectizarea unei cantități mici de material se pot folosi pungi din polietilenă (Traub, 1954) sau cutii metalice închise ermetic (fig. 30). Pentru cantități mai mari se amenajează camere speciale. Materialul dintr-un dulap sau două se așază pe rafturile de sîrmă ale unui cărucior special și se introduc în camera de tratament (Ellis, 1960). Tratamentul durează 24—48 ore utilizîndu-se tetraclorura de carbon, sulfura de carbon (inflamabilă), bromura de metil (Fosberg & Sachet, 1965) sau extract de *Pyrethrum* cu ciclohexanonă și DDT

sub formă de aerosoli (Archer, 1952). Folosirea lindanului recomandată de Petrović (1962), pentru tratarea macromicetelor în herbare, nu este indicată (Lellinger, 1972). Recent Stern (1968) citat de Lellinger (1972) recomandă utilizarea unui compus organofosforic denumit comercial „Dichlorvos" (același produs, fabricat în Polonia, se găsește în comerț sub denumirea de „Pol-Sanitozol"). După Lellinger (1972) fumigarea prin introducerea în dulapuri timp de 7—10 zile, a Dichlorvosului sub formă de benzi impregnate, este suficientă pentru protecția herbarelor.

Gazarea trebuie făcută cu respectarea normelor de protecție a personalului, deoarece substanțele folosite sînt toxice. Introducerea în fiecare dulap a unei mici cantități de naftalină sau paradiclorbenzen sub formă de granule, procedeu intens folosit, are același efect ca și gazarea, dacă dulapurile sînt închise ermetic (Savile, 1962). Dezinsectizarea întregii colecții cu acid cianhidric sau altă substanță este greu de realizat deoarece, pe de o parte, substanțele sînt extrem de nocive, iar pe de altă parte etanșarea unei încăperi este dificilă. Acest tip de tratament trebuie executat de personal specializat.

Tratamentul termic (O'Neill 1938; Fosberg & Sachet, 1965) constă în încălzirea plantelor la 44°, timp de cîteva ore, în dulapuri de metal prevăzute cu rezistențe electrice.

Otrăvirea prin imersarea, stropirea sau pensularea cu $HgCl_2$ (Fosberg & Sachet, 1965), formaldehidă (Steyermark, 1968) sau laurat de pentaclorfenil (Fosberg & Sachet, 1965; Fosberg, 1965; Whitmore, 1965) nu este o metodă potrivită pentru materialele micologice.

E. **Introducerea în colecție sau „inserarea".** Procedeele de aranjare a materialelor în herbare trebuie să îndeplinească trei condiții: protecția împotriva distrugerilor mecanice și a celor produse de foc și insecte; accesibilitate ușoară la exemplarul dorit; un sistem destul de flexibil care să permită mărirea colecției fără reorganizări frecvente și laborioase (Savile, 1962).

Depozitarea materialelor se poate face în diferite moduri și avantajele și dezavantajele fiecăruia sînt prezentate pe larg de Bartholomew (1931).

Aranjarea plicurilor în poziție verticală sub formă de fișe are avantajul economiei de spațiu și materiale și permite rearanjarea ușoară. Pentru colecțiile mici sau strict specializate acest mod de aranjare este ideal. Dezavantajul constă în faptul că exemplarele trebuie uniformizate ca

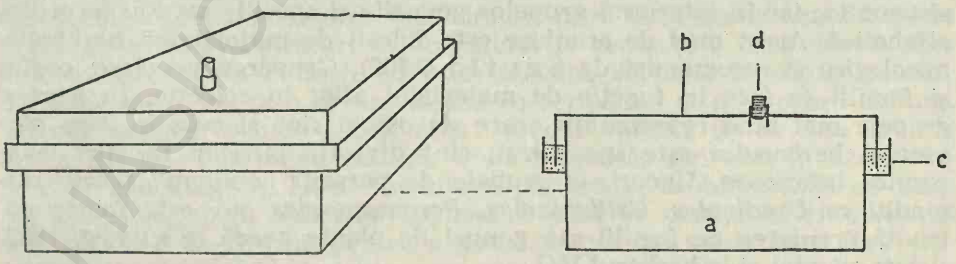


Fig. 30 — Cutie pentru gazat materialul de herbar:
a — cutie; *b* — capac; *c* — jgheab cu apă; *d* — dop

dimensiuni iar materialul fragil cade în partea de jos a plicurilor și cu timpul se fragmentează.

Pentru colecțiile mari, cea mai potrivită metodă este atașarea plicurilor pe coli de herbar și conservarea prin suprapunerea colilor. Plicurile se lipesc pe coli cu gumă arabică, doar atît cît să nu se deplaseze și să poată fi ușor dezlipite în cazul schimbării locului. La unele herbare s-a renunțat chiar la lipirea plicurilor dar acest lucru poate duce la amestecarea materialelor. Avantajul acestui sistem este că se pot examina în același timp toate exemplarele dintr-o specie, nu este necesară fragmentarea pentru introducerea în plicuri de dimensiuni standard și, deși sînt supuse permanent unei presiuni, materialele fiind plate nu se deteriorează. Exemplarele voluminoase se păstrează în cutii de diferite dimensiuni care se pun în cutii mari și acestea se introduc în compartimentele dulapurilor. Dezavantajele metodei constau în deplasarea permanentă a mai multor exemplare cînd se extrag unele mape, necesitatea unui spațiu suplimentar pentru consultare și îndoirea colilor în timpul manipulării. Aceste dezavantaje sînt evitate dacă cel care folosește materialele este familiarizat cu practica de herbar. Deficiența principală a metodei este o oarecare risipă de material și spațiu, mai ales atunci cînd pe coală se află doar un singur plic.

Colile pe care s-au lipit plicurile se introduc în mapele pentru specii. Numele speciei se scrie cu cerneală sau tuș negru, cu majuscule, în colțul din stînga-jos al mapei (nu în dreapta cum se practică la aproape toate herbarele), deoarece acest loc este mai accesibil pentru citirea numelor.

Introducerea în dulapuri a mapelor este o operație de mare importanță și răspundere și trebuie efectuată de personalul științific al herbarului, deoarece sistemul de ordonare a materialului nu este întotdeauna simplu, iar introducerea unui material într-un loc nepotrivit face aproape irecuperabil exemplarul în cauză.

Sistemele de ordonare sau aranjare sistematică în herbar sînt de mai multe feluri : pe grupe sistematice, pe zone geografice, alfabetic, sistematic și alfabetic, sau alte metode speciale. După F o s b e r g & S a c h e t (1965), ordonarea trebuie făcută după un sistem răspîndit, publicat, cunoscut specialiștilor. Un fișier auxiliar, cu numere care să indice locul diferitelor genuri, facilitează accesul la colecție al personalului auxiliar sau al vizitatorilor. Un sistem o dată adoptat trebuie respectat tot timpul.

Cel mai bun sistem pentru herbarele micologice este ordonarea pe grupe sistematice iar în interiorul grupelor genurile și speciile se pun în ordine alfabetică. Acest mod de aranjare este folosit de majoritatea herbarelor micologice și recomandat de S a v i l e (1962). Gruparea pe clase, ordine și familii se face în funcție de materialul aflat în colecție. În general grupele mai bine reprezentate, care de obicei sînt și cele în care personalul herbarului este specializat, sînt divizate pînă la ranguri taxonomice inferioare. Uneori, la grupele de paraziți „obligați" foarte răspîndiți ca *Uredinales, Ustilaginales, Peronosporales* etc. este foarte potrivită aranjarea pe familii sau genuri de plante gazdă (S a v i l e, 1962) sistem adoptat și la herbarul IMI.

În herbarul BUCM materialul este ordonat sistematic după schema de clasificare a ciupercilor propusă de A i n s w o r t h (1966), în următoarele

grupe : *Myxomycota, Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina* (excl. *Erysiphales), Erysiphales, Uredinales, Ustilaginales, Hymenomycetes & Gasteromycetes, Blastomycetes, Hyphomycetes, Coelomycetes.* În interiorul fiecărui grup genurile și speciile sînt ordonate alfabetic.
În unele herbare, materialele colectate de pe teritoriul țării gazdă sau al diferitelor zone geografice, tipurile, anumite colecții cu valoare științifică și istorică deosebită etc. se păstrează separat. Conservarea separată a tipurilor este în mod special recomandată (Fosberg & Sachet 1965 ; Váczy, 1971).

5.2.2. Culturi de referință

Metodele obișnuite folosite în herbare nu sînt totdeauna potrivite pentru conservarea mucegaiurilor (Carmichael, 1963). Ca și în cercetările pe materiale de herbar și în studierea ciupercilor microscopice, izolate și cultivate pe medii, este necesară conservarea materialului ca o „confirmare a prezenței microorganismului în cauză pe un anume substrat sau într-o anumită zonă geografică" (Kondo & al., 1959). În afara culturilor vii ciupercile pot și trebuie păstrate în herbare sub formă de culturi uscate. Acestea au avantajul că mențin caracterele inițiale ale ciupercii studiate.
De asemenea, culturile uscate, păstrate în herbar, pot fi desemnate ca tipuri ale taxonilor noi descriși, spre deosebire de culturile vii care, conform articolului 9 din codul de nomenclatură a plantelor (Stafleu & al., 1972), nu pot îndeplini această funcție.
Culturile de referință se obțin fie prin deshidratarea culturii împreună cu mediul, fie prin creșterea ciupercii pe un suport transparent, urmată de uscarea culturii împreună cu suportul.

A. **Culturile de referință, uscate.** O metodă, care constă în obținerea unei culturi pe mediu în vase Petri, omorîrea ciupercii, transferarea pe un suport rigid pentru deshidratare și apoi desprinderea de pe acest suport și conservarea, a fost folosită în mai multe laboratoare (Linn, 1942) și descrisă de Ellis (1960), Anonim (1968) și Onions (1971 a). Această metodă a fost simplificată și îmbunătățită de Pollack (1967) și, cu unele modificări aduse de noi, se rezumă la următoarele :
Se cultivă ciuperca în vas Petri pe un mediu favorabil pentru dezvoltare normală și sporulare. Cînd cultura a ajuns la stadiul dorit se „omoară" ciuperca cu vapori de formalină 40%. Pollack (1967) recomandă introducerea culturii într-un exsicator care conține formalină, dar aceasta se poate realiza mai simplu prin răsturnarea vasului Petri și turnarea cîtorva picături de formalină în capac sau, dacă din diferite motive răsturnarea culturii nu este indicată, se pune în capac un disc de hîrtie de filtru care se umectează cu formalină și se acoperă cultura. Timpul necesar pentru inactivarea culturii variază de la una la mai multe zile și viabilitatea culturii trebuie testată, mai ales în cazul ciupercilor zoopatogene. După inactivare cultura se deshidratează un timp nu prea lung, prin ridicarea capacului, pînă în momentul cînd agarul este suficient de flexibil pentru a putea fi scos din vasul Petri fără a se fragmenta. Dacă deshidratarea este prea înaintată cultura se transformă într-o peliculă subțire lipită strîns de vasul Petri. În capacul vasului Petri se toarnă 15 ml mediu apă de robinet-agar, fierbinte, la care s-a

adăugat 2,5% glicerină. Discul de agar purtînd cultura se scoate cu ajutorul unui bisturiu din vasul Petri și se așază peste mediul cald. După mai multe încercări am constatat că cea mai bună metodă constă în prepararea mediului, adăugarea glicerinei, distribuirea a cîte 15 ml în eprubete, conservarea în frigider și retopirea pe baia de apă în momentul folosirii. În cazul cînd există mediu apă de robinet-agar gata pregătit, conservat în eprubete, glicerina se poate adăuga după topire, înainte de folosire, cîte 6—7 picături în fiecare eprubetă. Mediul cu glicerină se toarnă peste formalina rămasă în capacul vasului Petri și în acest fel nu mai este contaminat cu alte ciuperci în timpul deshidratării. Cultura se acoperă cu o foaie de hîrtie pentru a fi ferită de praf și se lasă la temperatura laboratorului pentru deshidratare, cîteva zile, pînă cînd se transformă într-o peliculă subțire, transparentă și flexibilă, care poate fi dezlipită cu ușurință de pe capacul vasului Petri, mai ales dacă acesta este din material plastic. În cazul vaselor Petri de sticlă desprinderea este mai dificilă și este indicată introducerea a 3—4 picături de apă în centrul culturii, acoperirea cu vasul Petri și suspendarea deasupra băii de apă timp de cîteva minute, după care pelicula se dezlipește ușor. Culturile obținute în acest fel se introduc în plicuri din celofan și apoi în plicuri obișnuite de herbar, sau se lipesc pe rame circulare din carton și se introduc în suporturi speciale, confecționate tot din carton gros (fig. 31), care se pun la rîndul lor în plicuri de herbar. Este bine ca în suporturile de carton să se păstreze și un preparat microscopic obținut din aceeași cultură, înainte de deshidratare. În orice moment dintr-o astfel de cultură se poate pregăti un preparat microscopic prin tăierea unui fragment, înmuierea în soluție 3% de KOH și apoi montarea într-un mediu lichid. Ioniță (1973) înlocuiește mediul glicerinat cu o soluție din carboximetilceluloză 5% și glicerină 3%, iar Laundon (1968) deshidratează culturile pe un strat de clei din acetat de polivinil, pus pe o placă de plexiglas. Culturile mai pot fi deshidratate și pe suporturi transparente ca celuloidul (Linn, 1942), sticla (Espenshade, 1953) sau celofanul (Ainsworth, 1954). Cînd este necesară păstrarea culturilor obținute în eprubete se extrage cultura din eprubetă, se fixează cu adeziv și se lasă să se deshidrateze pe un suport din carton folosit la păstrarea preparatelor microscopice (Dade citat de Ainsworth, 1954).

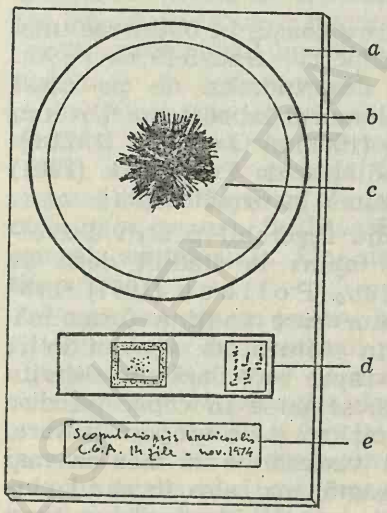


Fig. 31 — Suport pentru culturi de referință :
a — placa de bază, din carton ; *b* — inel din carton pentru fixarea culturii; *c* — cultura uscată ; *d* — preparat microscopic ; *e* — etichetă

B. **Culturi de referință pe celofan.** Metoda folosirii celofanului ca strat intermediar între mediul nutritiv și cultură a fost imaginată de Fleming & Smith (1944) și perfecționată de Jones (1950, 1956), Kondo & al. (1959) și Carmichael (1963).

Se taie discuri de celofan de dimensiuni potrivite pentru a încăpea în vase Petri.

Celofanul se intercalează cu discuri de hîrtie de filtru de aceleaşi dimensiuni, se pune în vas Petri şi se sterilizează, uscat, în autoclav, 20 minute la 121°. După sterilizare şi răcire se umectează discurile prin înmuiere în apă sterilă şi se aşază la suprafaţa mediului nutritiv agarizat (2,5% agar), solidificat, în vas Petri, avînd grijă să nu rămînă bule de aer sub celofan. Se păstrează la temperatura camerei 48 ore pentru a observa eventuale contaminări şi pentru ca excesul de umiditate să fie absorbit de mediu. În mijlocul celofanului se depune inoculul sub formă de suspensie sau ca disc obţinut dintr-o cultură. După ce colonia a ajuns la dezvoltarea dorită se inactivează cultura cu formaldehidă (vezi metoda anterioară) şi apoi celofanul se dezlipeşte de pe mediu şi se fixează pentru uscare într-o ramă din carton, imobilizîndu-l prin lipire cu adeziv şi/sau capsare. Uscarea se poate face şi într-o presă din plexiglas (Carmichael, 1963) care are rolul să evite încreţirea celofanului în timpul uscării. După montarea în rama de carton cultura se poate introduce în plicuri din celofan, hîrtie sau folie de polietilenă şi se conservă în dulapuri, într-un mod similar fişelor, sau în herbar. Kondo & al. (1959) fixează celofanul pe o placă de sticlă sau plexiglas ceea ce facilitează observarea microscopică şi fotografierea. Adezivul folosit este preparat din : 3 ml glicerină, 3 g gelatină, 0,2 g fenol, 100 ml apă. Srinivasan & al. (1971) montează şi păstrează culturile pe celofan în vase Petri din plastic.

Ciuperci din diferite grupe sistematice au fost cultivate şi preparate pentru herbar prin această metodă, iar recent Padhye (1969), a folosit-o pentru stadiile ascogene de la dermatofiţi.

5.2.3. Colecţii de preparate

Pentru economisirea timpului şi protejarea materialului este bine ca atunci cînd se analizează un material de herbar şi se obţine un preparat microscopic acesta să fie păstrat. Păstrarea preparatelor este foarte importantă în cazul materialelor „slabe", „sărace" şi, mai ales, cînd se analizează tipurile. Sînt situaţii cînd dintr-un exemplar nu se mai poate obţine decît un singur, ultim preparat, şi atunci este obligatorie menţionarea acestui lucru într-o notă introdusă în plic. Preparatele se pot păstra fie în interiorul plicului, însoţind exemplarul, fie într-o colecţie separată. Prima soluţie, considerată mai comodă, este utilizată la C.M.I.-Kew şi recomandată de Ellis (1960) şi Savile (1962). Deşi sînt protejate prin ambalarea în suporturi din carton sau chiar metalice (Weston, 1933) totuşi, în majoritatea cazurilor, preparatele pe care le-am consultat în diferite herbare au fost deteriorate. Pe de altă parte prezenţa preparatelor, chiar dacă materialele sînt manipulate cu grijă, produce deseori sfărîmarea exemplarelor fragile. Cea mai bună metodă constă în păstrarea preparatelor separat de materiale (Hansford, 1961 ; Fosberg & Sachet, 1965), în dulapuri speciale, în care se pot aranja în poziţie verticală. Preparatele se numerotează şi o notă purtînd indicaţia numărului se introduce în plicul de herbar, sau numărul preparatului se menţionează pe plic.

5.2.4. Preparate pentru muzeu

Micromicetele fitopatogene, macromicetele sau chiar ciupercile cultivate pe medii pot fi conservate ca exponate de muzeu. Aceste preparate nu au o valoare ştiinţifică deosebită, nu pot fi folosite pentru studii, dar sînt foarte potrivite pentru demonstraţii sau în scopuri didactice.

A. **Ciupercile fitopatogene** se pot prepara prin deshidratare sau dimpotrivă prin imersie în lichide conservante.

Ciupercile care atacă ramurile, tulpinile sau rădăcinile plantelor se deshidratează la temperatura laboratorului sau în etuvă şi apoi se montează în cutii din carton cu sticlă sau se aşază sub clopot de sticlă.

Majoritatea ciupercilor fitopatogene atacă frunzele şi pentru conservare este necesară presarea şi uscarea acestora, procedîndu-se ca în cazul prelucrării plantelor în vederea introducerii în herbar. După uscare, plantele se pun pe un suport din sticlă sau carton şi se acoperă cu pelicule transparente ca celofanul (Ehrlich, 1941; Ranzi, 1942) sau materiale plastice (De Zeeuw & Smith, 1963). Plantele pot fi impregnate cu răşini naturale ca şelacul (Willinson, 1949), dammar (Ranzi, 1942), balsam de Canada (Sharma & Saxena, 1956) sau cu parafină (McCubbin, 1928). Poliuretanul diluat 2/1 cu petrosin este recomandat de Bebbington & Burrell (1968) iar Richter (1961) şi Wismer & Hutchinson (1967) descriu modul de includere a materialului fitopatologic sau micologic în răşini sintetice.

— Conservarea în lichide a plantelor atacate de ciuperci cuprinde următoarele operaţii: spălarea materialului în apă, fixarea culorii, o nouă spălare, introducerea în lichidul de conservare. Această metodă este destul de veche şi s-au descris multe reţete. Carrera (1950) citează 19 lichide conservante.

Drummond-Gonçalves (1931, 1952) fixează în soluţie de sulfat de cupru 5%, timp de 6—24 ore, în funcţie de dimensiunile şi densitatea materialului, spală cu apă de robinet timp de cîteva ore şi conservă în soluţia: 15 ml acid sulfuros 5—6% la litrul de apă. Pentru fructe se mai adaugă 2—3% glicerină.

După fixarea culorii se pot folosi şi alte lichide conservante ca formaldehida 40%, 5 ml la 100 ml apă, sau 25 ml formaldehidă 40%, 150 ml alcool 95% şi 1 000 ml apă (Rapilly, 1968; Anonim, 1968).

Fixarea şi conservarea se pot face în acelaşi lichid: Se pun plantele într-o soluţie fierbinte care conţine o parte acid acetic glacial saturat cu cristale de acetat de cupru şi 4 părţi apă, şi se fierb. La început plantele se decolorează dar, după cîteva minute, culoarea începe să revină şi la momentul dorit se scot, se spală cu apă de robinet şi se conservă în soluţie 2—5% de formaldehidă 40% (Altman, 1966; Wismer & Hutchinson, 1967; Alexopoulos & Beneke, 1968).

Keefe (1926) fixează şi conservă în soluţia:

Alcool 95%	70 ml	
Formaldehidă 40%	5 ml	
Glicerină	2,5 ml	
Acid acetic glacial	2,5 ml	
Clorură de cupru	10 g	Materialul se introduce în soluţia rece şi
Azotat de uraniu	1,5 g	fixarea durează 1—10 zile.

Hemaff & Grey (1932) utilizează 2 soluții :

Soluția A		*Soluția B*	
Glicerină	100 ml	Glicerină	50 ml
Acid lactic	50 ml	Acid lactic	25 ml
Fenol	50 ml	Formaldehidă	25 ml
Acetat de Cu	20 ml	Apă pînă la	1 000 ml
Clorură cuprică	20 g		
Apă pînă la	1 000 ml		

Plantele se păstrează 4—5 zile în soluția *A* după care se trec în soluția *B* și aceasta se schimbă pînă cînd nu se mai colorează în verde-albăstrui (Carrera, 1950; Răpilly, 1968).

Pentru păstrarea culorii roșii, Hessler (Riker & Riker, 1936) propune următoarea soluție :

Apă distilată	1 000 ml
$ZnCl_2$	50 ml
Formaldehidă 40%	25 ml
Glicerină	25 ml

Se dizolvă la cald $ZnCl_2$ și se adaugă celelalte ingrediente. Se răcește și se decantează precipitatul format.

Preparatele fitopatologice se păstrează în flacoane sau borcane de sticlă închise ermetic.

B. **Ciupercile mari** constituie prin excelență preparate valoroase pentru muzeu. Prin simpla deshidratare unele *Aphyllophorales, Agaricales, Pezizales* etc. își păstrează formele, dimensiunile și culorile naturale.

Belorucev (1951) introduce corpurile fructifere într-un recipient și toarnă peste ele soluția Magnițki (5 g acid boric, 10 ml sulfat de zinc 5%, 200 ml formalină 10%, 10 ml apă distilată și 30 g zahăr). După 2—6 ore se scot și se lasă $^1/_2$ oră să se usuce, la întuneric și apoi se fixează în poziție verticală sub un clopot de sticlă închis etanș, în atmosferă de CO_2.

Hutchinson (1950) include corpurile fructifere în rășini sintetice. Exemplarele se deshidratează parțial prin spălare cu alcool 95% la presiune redusă și apoi se trec în vasul cu rășină (metacrilat de metil) sau se deshidratează complet, se impregnează cu amestecuri progresive de alcool și monomeri și apoi se imersează în metacrilat. Polimerizarea durează 18—24 ore după care blocul de rășină obținut se șlefuiește.

Parmelee (1971) propune următoarea metodă pentru realizarea unor mulaje din rășini epoxi : Se obține o fotografie color a ciupercii. Corpul fructifer în întregime, sau diferite părți (pălărie, picior) ale acestuia, se acoperă cu elastomeri care se vulcanizează la temperatura camerei. După 2—3 ore elastomerul se întărește și corpul fructifer se înlătură. În matrița obținută se toarnă rășina lichidă. După solidificarea rășinii (24 ore) se înlătură matrița, părțile se asamblează și apoi mulajul obținut se colorează folosind drept model fotografia color.

Liofilizarea (vezi subcapitolul 1.4 și 5.1.7) corpurilor fructifere și apoi impregnarea cu diferite soluții constituie metoda cea mai adecvată pentru realizarea exponatelor cu ciuperci cărnoase, fragile, cum ar fi reprezentanții genului *Coprinus*. Jones & Trevan (1950) imersează car-

poforii, după liofilizare, în ceară artificială „Seekay", timp de 10—30 secunde, iar Haskins (1960) le pulverizează cu rășini acrilice care le conferă rigiditate și împiedică rehidratarea fructificațiilor.

C. **Ciupercile microscopice,** cultivate și uscate printr-una din metodele descrise la subcapitolul 5.2.2., montate pe diferite suporturi, pot constitui, de asemenea, exponate de muzeu.

Bibliografie

AINSWORTH, G. C. (1954) — *Mycologia,* 46 : 110—111.
— (1966) — *Biblphy system. Mycol.,* 1966 (1) : 1—4.
AKAI, S. & ASADA, Y. (1961) — *Ann. phytopath. Soc. Japan,* 26 : 38—39.
AL-DOORI, Y. (1968) — *Mycologia,* 60 : 720—723.
ALEXOPOULOS, C. J. & BENEKE, E. S. (1968) — „Laboratory Manual for Introductory Mycology". Burgess Publishing Co., Minneapolis.
ALTMAN, J. (1966) — „Phytopathological Techniques. Laboratory Manual". Pruett Press, Inc., Boulder.
ANDERSON, W. H. & SKOVMAND, B. (1971) — *Phytopathology,* 61 : 1027.
ANONIM (1968) — „Plant Pathologist's Pocketbook". Commonwealth Mycological Institute — Kew.
— (1972) — „List of Cultures", Ed. 28. Centraalbureau voor Schimmelcultures — Baarn.
ANTHEUNISSE, J. (1972) — *Antonie van Leeuwenhoek,* 38 : 617—622.
— (1973) — *Antonie van Leeuwenhoek,* 39 : 243—248.
ARCHER, W. A. (1952) — *Science, N. Y.,* 116 : 233—234.
AREA LEÃO, A. E., MELLO, M. T. de & MAYOR, V. (1945) — *Mem. Inst. Osw. Cruz,* 42 : 559—608.
ARGUS, G. W. & SHEARD, J. W. (1972) — *Can. J. Bot.,* 50 : 2199—2209.
BAKERSPIGEL, A. (1953) — *Mycologia,* 45 : 596—604.
— (1954) — *Mycologia,* 46 : 680—681.
BALDASSERINI, G. & MUNGELLUZZI, C. (1965) — *Mycopath. Mycol. appl.,* 27 : 110—112.
BARE, R. O. & BARE, J. E. (1971) — *Bull. Torrey bot. Club,* 98 : 340—342.
BARNES, B. (1933) — *Trans. Br. mycol. Soc.,* 18 : 171—173.
BARTHOLOMEW, E. T. (1931) — *Mycologia,* 23 : 227—244.
BEAMAN, J. H. (1965) — *Taxon,* 14 : 127—133.
BEBBINGTON, R. M. & BURRELL, M. M. (1968) — *Bull. Br. mycol. Soc.,* 2 : 75.
BELORUCEV, E. A. (1951) — *Priroda,* 7 : 69.
BENEDEK, T. (1962) — *Mycopath. Mycol. appl.,* 17 : 255—260.
— (1963) — *Mycopath. Mycol. appl.,* 19 : 87—93.
BESCHEL, R. E. & SOPER, J. H. (1970) — *Can. J. Bot.,* 48 : 547—554.
BLACKWOOD, A. C. (1955) — *Bact. Rev.,* 19 : 280—283.
BOOTH, C. (1971*a*) — „The Genus *Fusarium*". Commonwealth Mycological Institute — Kew.
— (1971*b*) — *In* Booth. C. (Ed.) „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 49—94 — Academic Press, London & New York.
BRAENDLE, D. H. (1963) — In Martin, S. M. (Ed.) „Culture Collections ; Perspectives and Problems", p. 52—55. University of Toronto Press.
BRAVERMAN, S. W. (1970) — *Pl. Dis. Reptr,* 54 : 580—582.
— & CROSIER, W. F. (1966) — *Pl. Dis. Reptr,* 50 : 321—323.
BRENAN, J. P. M. (1974) — *Taxon,* 23 : 101—107.
BROMFIELD, K. R. & SCHMITT, C. G. (1967) — *Phytopathology,* 57 : 1133.
BUELL, C. B. & WESTON, W. H. (1947) — *Am. J. Bot.,* 34 : 555—561.
BUGBEE, W. M. & KERNKAMP, M. F. (1966) — *Pl. Dis. Reptr,* 50 : 576—578.
CAPPELLINI, R. A. & HAENSELER, C. M. (1958) — *Phytopathology,* 48 : 695—696.
CARMICHAEL, J. W. (1956) — *Mycologia,* 48 : 378—381.
— (1962) — *Mycologia,* 54 : 432—436.
— (1963) — *Mycologia,* 55 : 283—288.
CARPENTER, C. W. (1914) — *Phytopathology,* 4 : 394.
CARPENTER, E. I. (1932) — *Mycologia,* 24 : 512—514.

CARRERA, C. J. M. (1950) — *Bol. Fac. agron. vet. B. Aires*, p. 1—18.
CASTELLANI, A. (1939) — *J. trop. Med. Hyg.*, 42 : 255.
— (1961) — *J. trop. Med. Hyg.*, 64 : 60—63.
— (1962) — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 93 : 152—155.
— (1963) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 20 : 1—6.
— (1967) — *J. trop. Med. Hyg.*, 70 : 181—184.
CHU, D. (1970) — *Bi-mon. Res. Notes*, 26(5) : 48.
CLARK, W. A. & LOEGERING, W. Q. (1967) — *A. Rev. Phytopath.*, 5 : 319—342.
COLLETT, R. L. (1921) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 7 : 217—218.
CONSTANTINESCU, O. (1972) — *Studii Cerc. Biol., Ser. Bot.*, 24 : 455—460.
CORMACK, M. W. (1951) — *Can. J. Bot.*, 29 : 32—45.
COWLEY, C. W. & RINFERT, A. P. (1963) — In Martin, S. M. (Ed.) „Culture Collections : Perspectives and Problems", p. 180—184. University of Toronto Press.
CROWELL, I. H. (1941) — *Mycologia*, 33 : 137.
DADE, H. A. (1960) — In „Herb. I. M. I. Handbook", p. 40—69. Commonwealth Mycological Institute — Kew.
DAVIS, E. E. (1965) — *Mycologia*, 57 : 986—989.
—, HODGES, F. A. & GOOS, R. D. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 1432—1433.
DAYAL, H. M., SAXENA, B. N. & NIGAM, S. S. (1964) — *Indian J. exp. Biol.*, 2 : 62—64.
DE ZEEUW, D. J. & SMITH, N. A. (1963) — *Pl. Dis. Reptr*, 47 : 958—959.
DICK, M. V. (1965) — *Mycologia*, 57 : 828—831.
DRECHSLER, C. (1949) — *Phytopathology*, 39 : 503.
DRUMMOND-GONÇALVES, R. (1931) — *Revta Agric., S. Paulo*, 6 : 315.
— (1952) — *Biológico*, 18 : 188—191.
DUCHÉ, J. (1933) — *C. r. Séanc. Soc. Biol.*, 112 : 124.
EDWARDS, G. A., BUELL, C. B. & WESTON, W. H. (1947) — *Am. J. Bot.*, 34 : 551—555.
EHRLICH, J. (1941) — *Phytopathology*, 31 : 763—765.
ELBAKIAN, M. A. (1968) — *Byull. vses. nauch. — issled. Inst. Zasch. Rast.*, 2 : 34—38.
ELLIS, J. J. & ROBERSON, J. A. (1968) — *Mycologia*, 60 : 399—405.
ELLIS, M. B. (1960) — In „Herb. I. M. I. Handbook", p. 24—36. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
EMMONS, C. W. (1939) — *Mycopath. Mycol. appl.*, 2 : 320—321.
ESPENSHADE, M. A. (1953) — *Mycologia*, 45 : 309—312.
FENNELL, D. I. (1960) — *Bot. Rev.*. 26 : 79—141.
—, RAPER, K. B. & FLICKINGER, M. H. (1950) — *Mycologia*, 42 : 135—147.
FERGUS, C. L. & COLE, H. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 405.
FIGUEIREDO, M. B. (1967) — *Biológico*, 33 : 9—13
FISCHER, G. W. (1936) — *Phytopathology*, 26 : 1118—1127.
FLEMING, A. & SMITH, G. (1944) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 27 : 13—19.
FLOR, H. H. (1954) - *Phytopathology*, 44 : 469—471.
— (1967) — *Phytopathology*, 57 : 320—321.
FOSBERG, F. R. (1946) — *Scient. Monthly*, 63 : 429—434.
— (1965) — *Taxon*, 14 : 165—166.
— & SACHET, M.—H. (1965) — „Manual for Tropical Herbaria". *Regnum veg.*, 39 : 1—132.
GALLOWAY, L. D. (1936) — *Indian J. agric. Sci.*, 6 : 947—955.
GOLDIE-SMITH, E. K. (1956) — *J. Elisha Mitchell scient. Soc.*, 72 : 158—166.
GOOS, R. D., DAVIS, E. E. & BUTTERFIELD, W. (1967) — *Mycologia*, 59 : 58—66.
— & POLLACK, F. G. (1965) — *Mycologia*, 57 : 975—977.
GRASSO, V. (1957) — *Ricerca Sci.*, 27 : 88—91.
GREENE, D. M. (1972) — *Taxon*, 21 : 621—629.
GUIDA, V. O. & AMARAL, J. F. do (1949) — *Arq. Inst. biol., S. Paulo*, 19 : 203—206.
GUPTA, B. M. (1947) — *Curr. Sci.*, 16 : 94—95.
GUTTER, Y. & BARKAI-GOLAN, R. (1967) — *Israel Jnl Bot.*, 16 : 105—107.
HACSKAYLO, E. (1960) — *Mycologia*, 52 : 520—521.
HALL, A. V. (1972) — *Taxon*, 21 : 13—25.
— (1974) — *Taxon*, 23 : 23—28.
HAMILTON, J. M. & WEAVER, L. O. (1943) — *Phytopathology*, 33 : 612—613.
HANSFORD, C. C. (1961) — „The Meliolineae. A Monograph". *Sydowia, Beih*, 2 : 1—806.
HASKINS, R. H. (1957) — *Can. J. Microbiol.*, 3 : 477—485.
— (1960) — *Mycologia*, 52 : 161—164.
— & ANASTASIOU, J. (1953) — *Mycologia*, 45 : 523—532.
HEMAFF, M. & GREY, R. (1932) — *Bull. Soc. bot. Fr.*, 79 : 506.
HENRY, B. S. (1947) — J. Bact., 54 : 264.
HESSELTINE, C. W. (1947) — *Mycologia*, 39 : 126—128.

—, BRADLE, B. J. & BENJAMIN, C. R. (1960) — *Mycologia*, 52 : 762—774.
HOPPE, P. E. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 1411.
HUGHES, H. P. & MACER, R. C. F. (1964) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 47 : 477—484.
HUTCHINSON, S. A. (1950) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 33 : 43—44.
HWANG, S.-W. (1960) — *Mycologia*, 52 : 527—529.
— (1966) — *Appl. Microbiol.*, 14 : 784—788.
— (1968) — *Mycologia*, 60 : 613—621.
—, ANDERSON, A. L., PAPAVIZAS, G. C. & CONVERSE, R. H. (1968) — *Phytopathology*, 58 : 362—364.
— & HOWELLS, A. (1968) — *Mycologia*, 60 : 622—626.
HYRE, R. A. & ETTINGER, G. (1968) — *Pl. Dis. Reptr*, 52 : 507—508.
IIZUKA, H. & HASEGAVA, T. (1970) — (Ed.) „Culture Collections of Microorganisms". University Park Press, Baltimore & Manchester.
IONIȚĂ, I. (1973) — In „Metode de bio-preparare", p. 21—30. Muz. St. Nat. Ploiești.
IYENGAR, M. R. S., SRIVASTAVA, D. N. & SASTRY, M. L. N. (1959) — *Indian Phytopath.*, 12 : 90—98.
JAQUIOT, C. (1951) — *Revue Mycol.*, 16 : 27—29.
— & LEAUBIE, M. (1952) — *Revue Mycol.*, 17 : 168—170.
JOHNSON, T. (1941) — *Phytopathology*, 31 : 197—198.
JONES, W. (1950) — *Phytopathology*, 40 : 967.
— (1956) — *Phytopathology*, 46 : 131—132.
JONES, W. N. & TREVAN, J. W. (1950) — *Nature, Lond.*, 165 : 692.
JOVER, S. G. & PEREZ, C. A. de (1967) — *Rev. latinoam. Microbiol. Parasitolog.* 9 : 59—60.
KEEFE, A. M. (1926) — *Science, N. Y.*, 64 : 331.
KENDRICK, E. L. (1959) — *Phytopathology*, 49 : 454.
KERR, N. S. (1965) — *Bioscience*, 15 : 469.
KILPATRICK, R. A. (1956) — *Phytopathology*, 46 : 58.
—, HARMON, D. L., LOEGERING, W. Q. & CLARK, W. A. (1971) — *Pl. Dis. Reptr*, 55 : 871—873.
— & MOBLEY, C. L. (1967) — *Pl. Dis. Reptr*, 51 : 539—540.
KONDO, W. T. (1961) — *Phytopathology*, 51 : 407.
—, GRAHAM, S. O. & SHAW, G. C. (1959) — *Mycologia*, 51 : 368—374.
KRAMER, C. L. & MIX, A. J. (1957) — *Trans. Kans. Acad. Sci.*, 60 : 58—64.
KREITLOW, K. W. (1950) — *Phytopathology*, 40 : 16.
LANGE, B. J. & BOYD, W. J. R. (1968) — *Phytopathology*, 58 : 1711—1712.
LAST, F. T., PRICE, D., DYE, D. W. & HAY, E. M. (1969) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 53 : 328—330.
LATOURELLE, P., RANQUE, J. & NICOLI, R. M. (1966) — *Bull. Soc. Path. exot.*, 59 : 52—54.
LAUNDON, G. F. (1968) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 51 : 603—604.
LELLINGER, D. B. (1972) — *Taxon*, 21 : 91—95.
LINN, M. B. (1942) — *Phytopathology*, 32 : 546—547.
LITTLE, G. N. & GORDON, M. A. (1967) — *Mycologia*, 59 : 733—736.
LOEGERING, W. Q., HARMON, D. L. & CLARK, W. A. (1966) — *Pl. Dis. Reptr*, 50 : 502—506.
McCUBBIN, W. A. (1928) — *Phytopathology*, 18 : 1029.
MANEVAL, W. E. (1924*a*) — *Phytopathology*, 14 : 403—407.
— (1924*b*) — *Phytopathology*, 14 : 408—410.
MARTIN, S. M. (1963) — (Ed.) „Culture Collections : Perspectives and Problems". University of Toronto Press.
MAZUR, P. (1963) — In Martin, S. M. (Ed.) „Culture Collections : Perspectives and Problems", p. 59—70. University of Toronto Press.
— (1968) — In Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. (Ed.) „The Fungi", Vol. 3 : 325—394. Academic Press, London & New York.
— & SCHMIDT, J. J. (1968) — *Cryobiology*, 5 : 1—17.
MEHROTRA, B. S. & HESSELTINE, C. W. (1958) — *Appl. Microbiol.*, 6 : 179—183.
MEYER, E. (1955) — *Mycologia*, 47 : 664—668.
MILLER, J. J., KOCH, L. W. & HILDEBRAND, A. A. (1946) — *Proc. Can. phytopath. Soc.*, 14 : 14—15.
MOLINE, S. W., ROWE, A. W., DOEBBLER, G. F. & RINFERT, A. P. (1963) — In Martin, S. M. (Ed.) „Culture Collections : Perspectives and Problems", p. 185—188. University of Toronto Press.
MORSE. L. E. (1974) — *Taxon*, 23 : 29—43.
MOSEMAN, J. G. & POWERS, H. R. (1956) — *Phytopathology*, 46 : 469.
— & — (1957) — *Phytopathology*, 47 : 53—56.

NAGEL, C. M. (1938) — *Phytopathology*, 28 : 342—350.
NEGRUȚIU, T., ALBOIU, M. & DE SIMON, M. (1962) — „Liofilizarea". Ed. Agro-Silvică, București.
NORRIS, D. (1944) — *J. Aust. Inst. agric. Sci.*, 10 : 77.
NOVÁK, E. K. & GALGÓCZY, J. (1962) — *Acta bot. hung.*, 8 : 165—168.
O'NEILL, H. (1938) — *Rhodora*, 40 : 1—4.
ONIONS, A. H. S. (1969) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 52 : 173—174.
— (1971*a*) — In Booth, C. (Ed.) „Methods in Microbiology", Vol. 4 : 113—151. Academic Press, London & New York.
— (1971 *b*) — *Biol. J. Linn. Soc.*. 3 : 189—196.
OUELLETTE, G. B., BOUCHER, L. & CAUCHON, R. (1966) — *Bi-mon. Prog. Rep. Can. Dep. For.*, 22(3) : 1—2.
PADHYE, A. A. (1969) — *Mycologia*, 60 : 1242—1243.
PARMELEE, J. A. (1971) — *Greenhouse-Garden-Grass*, 10(4) : 73—77.
PARMENTIER, G. (1954) — *Parasitica*, 10 : 57—59.
PETERSON, J. L. & CAPPELLINI, R. A. (1962) — *Pl. Dis. Reptr*, 46 : 290—291.
PETROVIĆ, M. (1962) — *Glasn. Muz. Sum. Lov.*, 2 : 161—171.
POLLACK, F. G. (1967) — *Mycologia*, 59 : 541—544.
POPOV, I. S. (1966) — *Vest. Derm. Vener.*, 40 : 33—35.
PORTER, R. H. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 637—638.
POVAH, A. (1927) — *Mycologia*, 19 : 317—319.
PUNTONI, V. (1931) — *Annls Parasit. hum. comp.*, 9 : 359—362.
PURVIS, M. R. & BARNETT, H. L. (1952) — *Proc. W. Va. Acad. Sci.*, 24 : 65—67
RANZI, F. (1942) — *Int. Bull. Pl. Prot.*, 16 : 86M—89M.
RAPER, K. B. (1963) — In Martin, S. M. (Ed.) „Culture Collections : Perspectives and Problems", p. 81—93. University of Toronto Press.
— & ALEXANDER, D. F. (1945) — *Mycologia*, 37 : 499—525.
— & FENNELL, D. I. (1965) — „The Genus *Aspergillus*". Williams & Wilkins Co., Baltimore.
— & THOM, C. (1949) — „Manual of the Penicillia". Williams & Wilkins Co., Baltimore.
RAPILLY, F. (1968) — „Les techniques de mycologie en pathologie végétale". *Annls Epiphyt.*, 19 (no. hors serie) : 1—102.
REISCHER, H. S. (1949) — *Mycologia*, 41 : 177—179.
REYNOLDS, G. & LOCK, W. (1968) — *Pl. Dis. Reptr*, 52 : 961—962.
RHOADES, H. E. (1970) — *Am. J. vet. Res.*, 31 : 1867—1870.
RHODES, M. (1950) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 33 : 35—39.
RICH, A. E. (1970) — *Phytopathology*, 60 : 1309.
— (1971) — *Pl. Dis. Reptr*, 55 : 976.
RICHTER, A. (1961) — *NachrBl. dtsch. PflSchDienst, Berl., N. F.*, 15 : 159—160.
RIKER, A. J. & RIKER, R. S. (1936) — „Introduction to Research on Plant Diseases". J. S. Swift, St. Louis.
ROANE, C. W. (1973) — *Phytopathology*, 63 : 804.
ROLLINS, R. C. (1965) — *Taxon*, 14 : 115—120.
RONCADORI, R. W. & MATTHEWS, F. R. (1966) — *Phytopathology*, 56 : 1328—1329.
SAN ANTONIO, J. P. & HWANG, S. -W. (1970) — *J. Am. hort. Sci.*, 95 : 565—569.
SAVILE, D. B. O. (1962) — „Collection and Care of Botanical Specimens". Publ. no. 1113, Research Branch, Canada Dept, of Agric., Ottawa.
SCANDIFFIO, M. (1928) — *Phytopathology*, 18 : 247—248.
SCHEIN, R. D. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 653—657.
SHARMA, B. B. & SAXENA, B. N. (1956) — *Proc. Indian. Acad. Sci., Sect. B.*, 44 : 276—277.
SHARP, E. L. & SMITH, F. G. (1952*a*) — *Phytopathology*, 42 : 263—264.
— & — (1952*b*) — *Phytopathology*, 42 : 480.
— & — (1957) — *Phytopathology*, 47 : 423—429
SHETLER, S. G. (1969) — *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 82 : 687—758.
SIMMONS, E. G. (1963) — In Martin, S. M. (Ed.) „Culture Collections : Perspectives and Problems", p. 100—110. University of Toronto Press.
SINGH, R. K. (1958) — *Indian Phytopath.*, 11 : 186.
SINSKI, J. T., SMITH, F. X. & LOWE, E. P. (1968) — *Mycologia*, 60 : 444—445.
SMITH, A. C. (1966) — *Taxon*, 15 : 201—205.
SMITH, C. O. (1940) — *Phytopathology*, 30 : 278—280.
SMITH. D. H., LEVIS, F. H. & FERGUS, C. L. (1970) — *Pl. Dis. Reptr*, 54 : 217—218.
SMITH, G. (1971) — „An Introduction to Industrial Mycology", Ed. 6. Edward Arnold, London.
SMITH, R. S. (1967) — *Mycologia*, 59 : 600—609.
— (1972) — *Mycologia*, 63 : 1218—1221.
SNYDER, W. C. & HANSEN, H. N. (1946) — *Mycologia*, 38 : 455—462.

SOLEL, Z. (1970) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 54 : 504—506.
SOPER, J. H. & PERRING, F. H. (1967) — *Taxon*, 16 : 13—19.
SRINIVASAN, M. C., CHIDAMBARAM, P., MATHUR, S. B. & NEERGAARD, P. (1971) — *Trans. Br. mycol. Soc.*, 56 : 31—35.
STAFFELDT, E. E. (1961) — *Phytopathology*, 51 : 259.
— & SHARP, E. L. (1954) — *Phytopathology*, 44 : 213—215.
STAFLEU, F. A. & al. (1972) — „International Code of Botanical Nomenclature". *Regnum veg.* 82 : 1—426.
STEBBINS, M. E. & ROBBINS, W. J. (1949) — *Mycologia*, 41 : 632—636.
STEWART, D. M. (1956) — *Phytopathology*, 46 : 234—235.
STEYERMARK, J. A. (1968) — *Taxon*, 17 : 61—64.
SUSSMAN, A. S. (1968) — In Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. (Ed.) „The Fungi", Vol. 3 : 447—486. Academic Press, London & New York.
TACHIBANA, H. (1962) — *Phytopathology*, 52 : 754.
TAUBENHAUS, J. J. & EZEKIEL, W. N. (1934) — *Phytopathology*, 24 : 18—19.
TESH, R. B., SCHNEIDAU, J. D. & ERWIN, C. (1967) — *Am. J. clin. Path.*, 48 : 100—103.
TRAUB, H. P. (1954) — *Taxon*, 3 : 84—88.
TUITE, J. (1968) — *Mycologia*, 60 : 591—594.
— (1969) — „Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria". Burgess Publ. Co., Minneapolis.
VÁCZY, C. (1971) — *Contrţii bot. Univ. Babeş-Bolyai Cluj*, 1971 : 409—412.
VERONA, O. (1946) — *Nuovo G. bot. ital.*, 53 : 323—325.
WEISS, F. A. (1957) — In „Manual of Microbiological Methods" p. 99—119. McGraw-Hill Co., New York.
— & HWANG, S. -W. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 466.
— & OTEIFA, B. A. (1953) — *Phytopathology*, 43 : 407.
WELLMAN, A. M. (1967) — *Can. J. Microbiol.*, 13 : 665—672.
WERNHAM, C. C. (1946) — *Mycologia*, 38 : 691—692.
— & MILLER, H. J. (1948) — *Phytopathology*, 38 : 932—934.
WESTERDIJK, J. (1947) — *Antonie van Leeuwenhoek*, 12 : 223—231.
WESTON, W. H. (1933) — *Mycologia*, 25 : 317—320.
WHITE, W. L. & DARBY, R. T. (1952) — *Mycologia*, 54 : 578—580.
WHITMORE, T. C. (1965) — *Taxon*, 14 : 164—165.
WILHELM, S. (1955) — *Phytopathology*, 45 : 180—181.
WILLINSON, R. S. (1949) — *Phytopathology*, 39 : 414—415.
WISMER, C. A. & HUTCHINSON, P. B. (1967) — *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technologists*, 12th Congress, Puerto Rico, 1965, p. 1206—1212.
ZILLER, W. G. & LOWE, D. P. (1968) — „A Herbarium for Forest Pathology". Inf. Rep., Forest Res. Lab., Victoria, B. C., BC—X—22.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Index de autori

A

Acha, I. G., 106, *151*
Acree, S. F., 116, *155*
Addicott, F., 98, *151*
Afanasiev, M. M., 44, *45*
Agnihothrudu, V., 26, *45*
Ainsworth, G. C., 14, *18*, 180, 182, *186*
Akai, S., 168, *186*
Akhtar, C. M., 29, *45*
Alboiu, M., 168, 169, *189*
Alcorn, G. D., 54, *79*
Al-Doori, Y., 167, *186*
Alexander, D. F., 168, *189*
Alexopoulos, C. J., 12, 14, *18*, *19*, 61, 63, 69, 71, *79*, *81*, 120, 132, 136, *151*, 184, *186*
Allen, M., 88, *151*
Allen, P. J., 149, *152*
Altman, J., 24, 25, *45*, 52, 57, 61, 63, 66, 71, *79*, 95, 111, 132, 135, 141, *151*, 184, *186*
Amann, J., 65, *79*
Amaral, J. F. do, 166, *187*
Ames, L. M., 101, *151*
Anastasiou, J., 168, *187*
Andersen, A. A., 17, *18*, 85, *151*
Andersen, A. L., 29, *45*
Anderson, A. L., 172, *188*
Anderson, W. H., 172, *186*
Andleigh, H. S., 92, *151*
Anonim, 8, *18*, 59, 65, *79*, 84, 87, 89, 95, 101, 102, 105, 108, 112, 125, 132, 135, 136, 143, 147, *151*, 173, 181, 184, *186*
Antheunisse, J., 161, 170, *186*
Anthony, E. H., 72, *79*
Antoine, H., 52, *79*
Apple, J. L., 121, *153*
Aragaki, M., 147, 148, *153*, *154*
Archer, W. A., 179, *186*
Arêa-Leão, A. E., 173, 174, *186*
Argus, G. W., 178, *186*
Ark, P. A., 91, *151*
Armitage, F. D., 54, *79*
Armstrong, G. M., 96, *151*
Armstrong, J. K., 96, *151*
Arnold, A. J., 17, *18*
Aron, D. I., 115, *153*
Artman, J. D., 49, *79*
Asada, Y., 168, *186*
Aschner, M., 117, *151*
Asthana, R. P., 96, *151*
Aubé, C., 51, *79*
Ayers, W. A., 88, *155*

B

Baba, A. I., 53, *81*
Babos, L., 13, *18*
Backus, M. P., 128 *151*
Badcock, E. C., 96, *151*
Bagga, H. S., 141, *151*
Baker, E. P., 58, *82*
Baker, K. F., 33, *47*
Baker, R., 28, *46*
Bakerspigel, A., 72, *79*, 165, *186*
Baldasserini, G., 167, *186*
Ballard, J. C., 124, *154*
Bare, J. E., 176, *186*
Bare, R. O., 176, *186*
Barghoorn, E. S., 66, *79*
Barkai-Golan, R., 164, *187*
Barnes, B., 97, 127, *153*, 173, *186*
Barnett, H. L., 85, 97, 116, 117, 124, 127, 130, *151*, *154*, *155*, *157*, 162, *189*
Barratt, R. W., 131, *157*
Barrett, J. T., 142, *151*
Barron, G. L., 27, 30, 31, 33, *45*, 49, *79*
Bartholomew, E. T., 179, *186*
Bas, C., 12, *18*
Batra, L. R., 139, *156*
Bazinov, A. G., 88, *154*
Beadle, G. W., 130, 131, 145, *151*
Beaman, J. H., 174, *186*
Beard, J. S., 10, *18*
Bebbington, R. M., 184, *186*
Beech, F. W., 122, *151*
Beever, R. E., 101, *151*
Bell, D. K., 98, *151*
Bell, F. H., 58, *79*
Belorucev, E. A., 185, *186*
Bemiller, P. M., 61, *81*
Benedek, T., 50, *79*, 93, 108, 113, *151*, 167, 174, *186*
Beneke, E. S., 12, 14, *18*, 61, 63, 69, *79*, 132, 136, *151*, 184, *186*
Benham, R. W., 142, *151*
Benjamin, C. R., 164, 170, *188*
Benjamin, R. K., 136, *151*
Berger, C. L., 140, *155*
Berger, R. D., 17, *18*
Berk, S., 128, *151*
Berliner, M. D., 134, *151*
Berry, F. H., 50, *79*
Berry, J. A., 90, *151*
Beschel, R. E., 178, *186*
Bessis, M., 52, 53, *81*
Bevan, E. A., 45, *45*, *46*
Bevege, D. I., 58, *79*
Billotte, J. M., 106, *151*
Biourge, P., 97, *151*
Bisby, G. R., 49, 66, *79*
Bissett, J., 32, *45*
Blackburn, F., 124, *151*
Blackwood, A. C., 168 *186*
Blakeslee, A. F., 125, *151*
Blank, I. H., 92, *151*
Blochwitz, A., 133, *151*
Bloos, H. E., 98, *157*
Bocobo, F. C., 142, *151*
Boedijn, K. B., 53, 54, *79*
Bogdan, A. T., 53, *81*
Bohus, G., 13, *18*
Boidin, J., 61, *79*
Bojanovsky, R., 92, *151*

Bollard, E. G., 101, *151*
Bonner, J., 98, *151*
Boone, D. M., 101, 126, *151*
Booth, C., 11, *18*, 22, 23, 38, 44, *45*, 71, 72, *79*, 84, 87, 92, 93, 94, 96, 97, 99, 101, 102, 103, 105, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 120, 122, 125, 132, 133, 134, 135, 136, 138, 141, 142, 143, 146, 147, *151*, 165, 173, *186*
Booth, T., 94, *151*
Bose, A., 149, *152*
Bose, R. G., 103, *151*
Boucher, L., 176, *189*
Bouhot, D., 106, *151*
Boullard, B., 27, 28, *45*, 49, *79*
Bourdillon, R. B., 17, *18*
Boyd, W. J. R., 166, *188*
Bradle, B. J., 164, 170, *188*
Braendle, D. H., 160, *186*
Brandsberg, J. W., 27, *45*
Brandt, W. H., 60, *82*
Braverman, S. W., 123, *153*, 164, *186*
Brenan, J. P. M., 178, *186*
Bretz, T. W., 50, *79*
Brian, P. W., 104, *154*
Bridgman, G. H., 101, *154*
Bromfield, K. R., 172, *186*
Browder, L. E., 15, *18*
Brown, J. F., 58, *82*
Brown, J. H., 76, *79*
Brown, W., 91, 99, 116, *151*
Bruehl, G. W., 25, *45*, 141, *151*
Brummelen, J. van, 12, *18*, 66, *79*, 107, *152*
Buckley, H. R., 37, *45*, 92, *152*
Buddenhagen, I. W., 111, 127, *152*
Buell, C. B., 163, 164, 170, *186*, *187*
Bugbee, W. M., 171, 172, *186*
Buller, A. H., 107, *152*
Bump, C. M., 128, *152*
Burges, N. A., 32, *47*
Burkholder, P. R., 123, *152*
Burleigh, J. R., 17, *18*
Burrell, M. M., 184, *186*
Burton, H., 88, *157*
Busch, K. A., 110, *152*
Bushnell, W. R., 149, *152*
Butler, E. E., 48, *79*, 142, *156*
Butterfield, W., 171, *187*

C

Calvert, O. H., 111, *152*
Campbell, R., 76, *79*
Cantino, E. C., 99, *154*
Cappellini, R. A., 104, *152*, 164, *186*, *189*
Carley, H. E., 89, *157*
Carlile, M. J., 14, *18*, 99, *152*
Carmichael, J. W., 54, 65, 70, 72, *79*, 162, 181, 182, 183, *186*
Carpenter, C. W., 174, *186*
Carpenter, E. I., 161, *186*
Carrera, C. J. M., 184, 185, *187*
Carson, J. H., 118, *155*
Cassell, R. C., 15, *19*
Casselman, T. W., 17, *18*
Castellani, A., 161, 167, *187*
Cauchon, R., 176, *189*
Chace, W. G., 103, 106, *152*
Chandler, W. A., 25, *45*
Chassain, M., 14, *18*
Cherry, E., 15, *18*, *19*
Chesters, C. G. C., 26, 28, 29, *45*
Chidambaram, P., 183, *190*
Child, J. J., 87, 149, *152*
Chilton, P., 40, *45*
Ch'in, T. L., 92, *152*
Christensen, C. M., 125, *154*
Chu, D., 86, *152*, 161, *187*
Chupp, C., 68, *79*
Ciccarone, A., 57, *79*
Ciferri, R., 73, *79*
Clark, J. W., 90, *152*
Clark, W. A., 169, 171, 172, 173, *187*, *188*
Claus, D., 86, *152*
Claussen, P., 105, *152*
Clémençon, H., 13, *18*
Cobb, F. W., 101, *154*
Cochrane, V. W., 83, *152*
Codner, R. C., 85, *152*
Coffey, M. D., 149, *152*
Coicev, A., 128, *156*
Cole, G. T., 77, *79*
Cole, H., 164, *187*
Collett, R. L., 158, *187*
Collier, D. C., 53, *82*
Collins, T. I., 17, *18*
Conn, H. J., 53, 55, 56, 60, 61, *79*
Conolle, M. D., 37, *45*
Constantinescu, O., 175, *187*
Converse, R. H., 111, *152*, 172, *188*
Cook, W. R. I., 138, *155*
Cooke, W. B., 35, 36, *45*, 84, 92, 108, 110, 122, 130, 135, *152*
Cordon, T. C., 87, *157*
Cormack, M. W., 165, *187*
Cosicov, C. V., 41, *45*
Covert, S. V., 50, *79*
Cowley, C. W., 171, *187*
Cowling, E. B., 102, *156*
Cox, R. S., 42, 45, *45*
Craig, J., 88, *154*
Crawford, J. L., 98, *151*
Crosby, F. L., 17, *18*
Crosier, W. F., 164, *186*
Crowell, I. H., 174, *187*
Cruickshank, I. A. M., 127, *152*
Cunningham, J. L., 51, 56, 61, 69, *79*
Cuppett, V. M., 116, *152*
Cutter, V. M., 131, *157*
Czapek, F., 105, *152*

D

Dade, H. A., 53, 54, 62, 63, 64, 65, 67, 71, 73, *79*, 83, 91, 97, 102, 105, 125, 136, *152*, 160, 161, 163, *187*
Daft, G. C., 59, *79*
Daniel, J. W., 107, *152*
Darby, R. T., 162, *190*
Darlington, C. D., 61, *79*
Darlow, H. M., 89, *152*
Darrow, M. A., 53, 55, 56, 60, 61, *79*
Davenport, R. R., 122, *151*
Davey, C. B., 96, 106, 109, 126, 147, *155*
Davies, D. A. L., 13, *18*
Davies, J. D., 93, *152*
Davies, R. R., 16, *18*
Davis, D. R., 17, *18*
Davis, E. E., 169, 171, *187*
Davis, W. H., 60, *79*
Dawson, N. T., 143, *156*

Dayal, H. M., 174, *187*
DeLamater, E. D., 60, 69, *79*
Dementjewa, G., 64, 73, *82*
Dennis, R. W. G., 53, 61, *79*
De Simon, M., 168, 169, *189*
Deverall, B. J., 90, *152*
De Vroey, C., 142, *152*
De Zeeuw, D. J., 184, *187*
Dhavantari, B. N., 112, *152*
Dick, M. W., 109, *152*, 167, *187*
Dickey, R. S., 91, *151*
Dickinson, S., 38, 40, 41, 45, *45*
Diehl, W. W., 68, *79*, 138, *152*
Diener, U. L., 58, *79*, 147, *152*
Dimock, A. W., 17, *19*
Dimond, A. E., 115, *152*
Dinoor, A., 40, *46*
Disbrey, B. D., 51, 62, *79*
Dishon, I., 98, *155*
Dixon, S. M., 51, 54, *80*
Doebbler, G. F., 171, *188*
Domsch, K. H., 32, *45*
Douglas, H. C., 147, *155*
Dowson, W. J., 85, *152*
Dox, A. W., 106, *152*
Drake, C. R., 58, *79*
Drandarevsky, C., 58, *79*
Drechsler, C., 161, *187*
Dring, D. M., 49, 53, 56, 60, 64, 65, 66, *79*
Dring, V. G., 119, *154*
Druett, H. A., 18, *19*
Drummond-Gonçalves, R., 184, *187*
Duché, J., 85, *152*, 173, *187*
Duddington, C. L., 51, 54, *80*
Dulaney, E. L., 117, *152*
Dunn, M. S., 39, 41, *45*
Durand, E. J., 57, *80*
Durell, L. W., 28, *46*
Durie, E. B., 16, *19*
Dye, D. W., 169, *188*

E

Ebert, H., 128, *151*
Eckert, J. W., 93, 136, *152*
Edgerton, C. W., 39, 41, *45*
Edwards, G. A., 163, *187*
Eggins, H. O. W., 103, *152*
Ehrlich, J., 184, *187*
Eichenmuller, J. J., 111, 143, *156*
Eilers, F. I., 121, *152*
El-Badry, H. M., 41, *45*
Elbakian, M. A., 166, *187*
Eliade, E., 11, 12, *18*
Elliott, E. C., 86, 87, 89, *152*
Elliott, J. A., 110, *152*
Ellis, J. J., 170, *187*
Ellis, M. B., 35, *45*, 49, *80*, 175, 178, 181, 183, *187*
Emerson, R., 90, 110, 142, *152*, *153*
Emmel, V. M., 53, 55, 56, 60, 61, *79*
Emmons, C. W., 174, *187*
Ende, G. van den, 61, *80*
Endo, R. M., 50, *80*
Epps, W. M., 112, *154*
Epstein, S. S., 92, *153*
Erwin, C., 159, *190*
Espenshade, M. A., 182, *187*
Ettinger, G., 159, *188*
Evans, E., 33, *45*
Eveleigh, D. E., 87, 149, *152*
Evlahova, A. A., 61, *80*
Ezekiel, W. N., 42, *45*, 158, *190*

F

Farris, S. H., 52, 56, *80*
Faust, M. A., 55, *80*
Fazli, S. F. I., 142, *153*
Feder, N., 53, *80*
Feder, W. A., 50, *80*
Felix, E. L., 142, *153*
Fell, J. W., 36, *45*
Fennell, D. I., 21, *47*, 106, 110, 112, 116, 117, 119, 125, 129, 137, *156*, 158, 160, 161, 162, 163, 165, 166, 168, 169, 170, 171, 174, *187*, *189*
Fergus, C. L., 131, *153*, 164, *187*, *189*
Figueiredo, M. B., 167, *187*
Fischer, G. W., 158, *187*
Fischer, J. B., 98, *153*
Flannigan, B., 31, *45*
Fleischman, A. I., 118, *155*
Fleischmann, G., 40, *46*
Fleming, A., 55, 65, 66, 68, 72, *80*, 182, *187*
Flentje, N. F., 100, 143, *153*
Flickinger, M. H., 163, 170, *187*
Flor, H. H., 159, *187*
Follin, J. C., 111, *153*
Fosberg, F. R., 8, 10, *19*, 174, 175, 178, 179, 180, 181, 183, *187*
Fothergill, P. G., 113, *153*
Fraymouth, J., 57, *80*
Fred, E. B., 149, *157*
Frey, D., 16, *19*
Fries, L., 114, *153*
Fries, N., 113, *153*
Fritsch, P., 59, *80*
Fuller, M. S., 94, *153*
Furtado, J. S., 59, 60, *80*
Fusaro, R. M., 90, *153*

G

Gabe, M., 53, *80*
Gaboreanu, M., 53, *81*
Gaertner, A., 94, *153*
Gagnon, C., 72, *80*
Galgóczy, J., 164, 166, *189*
Gallegly, M. E., 111, 143, 147, *156*
Galleymore, B. H., 100, 143, *153*
Galloway, L. D., 166, *187*
Gams, W., 30, 32, *45*, 104, *153*
Garrett, S. D., 90, *153*
Gay, J. L., 61, *80*
Gayed, S. K., 106, 118, *153*
Georg, L. K., 44, *46*
Georgala, D. L., 86, 87, 89, *152*
Gerdemann, J. W., 58, *80*, 88, *157*
Chafoor, A., 138, *153*
Ghosh, G. R., 100, *154*
Giddings, N. J., 86, *153*
Gindrat, D., 91, 115, *153*
Glick, D., 61, *80*
Gochenaur, S. E., 28, *46*
Goepp, R. M., 61, *81*
Goldie-Smith, E. K., 166, *187*
Goldstein, S., 117, *153*
Gomori, G., 61, *80*
Goode, M. J., 112, *153*
Goode, P. M., 111, *153*
Gooding, G. V., 132, *153*
Goos, R. D., 57, *80*, 117, *153*, 160, 171, *187*
Gordon, M. A., 164, *188*

Gorman, J. W., 140, *153*
Gottlieb, D., 127, *156*
Gough, F. J., 111, 143, *156*
Graham, G. F., 106, *157*
Graham, J. H. R., 123, *153*
Graham, S. O., 181, 182, 183, *188*
Grainger, P. N., 141, *153*
Gram, K., 57, *80*
Grant, C., 26, *46*
Grasso, V., 161, *187*
Gray, P., 52, 53, 69, 70, *80*
Gray, P. H. H., 60, *80*
Gray, T. R. G., 22, 26, 27, 28, 31, 33, *47*, 49, *81*
Gray, W. D., 95, *153*
Greathouse, G. A., 86, *156*
Greaves, H., 26, *46*
Green, R. J., 143, *153*
Greene, D. M., 178, *187*
Gregory, P. H., 16, *19*
Greslags, J. H., 128, *153*
Grey, R., 185, *187*
Griebel, G. E., 143, *155*
Gries, G. A., 98, *157*
Griffin, D. M., 32, *46*
Griffiths, E., 32, *46*
Groat, R. A., 70, *80*
Grosjean, J., 57, *80*
Grouet, D., 60, *80*
Grunberg, E., 131, *157*
Grund, D. W., 61, *80*
Grutter, F. H., 117, *152*
Guida, V. O., 166, *187*
Gupta, B. M., 161, *187*
Gupta, D. D., 39, *46*
Gupta, P. K., 122, *153*
Gurr, E., 54, 61, *80*
Gustafsson, M., 140, *153*
Guthrie, E. J., 40, *46*
Gutter, Y., 164, *187*
Guyotjeannin, C., 61, 74, *80*, *81*
Güssow, H. T., 72, *80*
Gwynne-Vaughan, H. C. I., 97, 127, *153*

H

Haasis, F. A., 142, *153*
Hacskaylo, E., 161, *187*
Haenseler, C. M., 164, *186*
Hagedorn, D. J., 61, *79*
Haglund, W. A., 96, *153*
Hall, A. V., 178, *187*
Hamilton, J. M., 159, *187*
Hammersley, V. L., 115, *154*
Hanke, M. E., 61, *80*
Hanlin, R. T., 13, *19*
Hanna, W. F., 39, 40, *46*
Hansen, H. N., 44, *46*, 88, 134, *153*, *156*, *157*, 173, *189*
Hansen, H. W., 18, *19*
Hansford, C. G., 49, *80*, 183, *187*
Hanson, E. W., 58, *81*
Hanusova, M., 125, *153*
Hardison, J. R., 64, *81*
Harley, J. L., 32, *46*
Harmon, D. L., 171, 172, *188*
Harnish, W. N., 111, *153*
Harper, G. J., 18, *19*
Harrold, C. E., 119, *153*
Hart, J. H., 146, *153*
Hartmann, G. C., 74, *80*
Harvey, I. C., 78, *80*
Hasegava, T., 160, *188*
Haskins, R. H., 13, *19*, 168, 169, 186, *187*
Hassan, H. M., 106, 118, *153*
Hawker, L. E., 57, *80*, 96, *151*
Hay, E. M., 169, *188*
Hayashi, H., 110, *154*
Hayes, W. A., 124, *151*
Hayman, D. S., 59, *81*
Haynes, W. C., 110, *153*
Hemaff, M., 185, *187*
Hemming, H. G., 104, *154*
Henderson, D. M., 11, *19*, 51, *80*
Henderson, S. A., 61, *80*
Hendrix, F. F., 100, 113, *154*
Hendrix, J. W., 116, 121, *153*
Hennebert, G. L., 20, *46*
Henry, B. S., 164, *187*
Hering, F. T., 58, *80*
Hering, T. F., 32, *46*
Hermansen, J. E., 18, *19*
Herrick, H. T., 116, *155*
Herrick, J. A., 86, *153*
Hervey, A., 84, 139, *156*
Hesseltine, C. W., 110, 129, *153*, 162, 164, 170, *187*, *188*
Hickman, C. J., 111, 141, *153*, *156*
Hildebrand, A. A., 165, *188*
Hildebrand, E. M., 38, 45, *46*
Hilty, J. W., 91, 111, *153*, *156*
Hine, R. B., 147, *153*
Hintikka, V., 13, *19*
Hirst, J. M., 17, *19*
Hoagland, D. R., 115, *153*
Hoareau, M., 85, *152*
Hodges, F. A., 171, *187*
Hodgson, W. A., 119, 141, *153*
Holliday, P., 133, *153*
Hollomon, D. W., 93, *153*
Honeycutt, M. B., 32, *46*
Hooker, A. L., 38, *46*, 150, *153*
Hooker, W. J., 52, *80*
Hopkins, E. F., 92, *153*
Hopkins, J. C., 17, *19*
Hoppe, P. E., 158, *188*
Hora, F. K., 120, *154*
Hornby, D., 30, *46*, 100, 131, *153*, *154*
Horne, A. S., 119, *154*
Horner, C. E., 93, *155*
Hornstein, E. A., 99, *154*
Horsfall, J. C., 115, *152*
Horton, J. C., 106, *154*
Hoseney, F. V., 13, *19*
Hotson, H. H., 119, *154*
Howells, A., 171, *188*
Hristov, A., 60, *80*
Huber, D. M., 29, 34, *45*, *46*, 89, *157*
Hubert, E. E., 57, *80*
Hudson, H. J., 35, *46*
Hughes, H. P., 170, *188*
Hughes, J. E., 17, *18*
Huisman, O., 25, *45*
Hulea, A., 87, *154*
Hulton, R. L., 60, *81*
Humphrey, C. J., 116, *155*
Hunt, R. S., 101, *154*
Husain, S. M., 17, *19*
Hutchins, P. C., 50, *80*
Hutchinson, P. B., 184, *190*
Hutchinson, S. A., 185, *187*
Hutchinson, W. G., 57, *80*
Hwang, S.-W., 166, 170, 171, 172, 173, *188*, *189*, *190*
Hylin, J. W., 148, *154*
Hylin, V., 148, *154*
Hyre, R. A., 159, *188*

I

Iablokova, V. A., 61, *80*
Iizuka, H., 160, *188*
Ingold, C. T., 119, *154*
Ioniţă, I., 50, *80*, 182, *188*
Isaac, P. K., 57, 60, 67, 69, 72, *80*
Itô, K., 110, *154*
Iulius, A. A., 88, *154*
Ive, F. A., 37, *46*
Iyengar, M. R. S., 164, *188*

J

Jaquiot, C., 164, *188*
Jauch, C., 42, *46*
Jechová, V., 61, *82*
Jefferys, E. G., 104, *154*
Jenne, G., 10, *19*
Jensen, W. A., 60, 61, *80*
Jewell, F. F., 57, *80*
Joffe, A. Z., 98, *154*
Johann, H., 129, *154*
Johansen, D. A., 53, *80*, 125, *154*
Johansen, H. B., 18, *19*
John, H. J., 87, *157*
Johnson, A. L. S., 86, *154*
Johnson, H. W., 128, *154*
Johnson, L. F., 30, *46*
Johnson, T., 159, *188*
Johnson, T. W., 34, *46*, 90, 94, 95, *154*
Jones, D., 32, *46*
Jones, D. R., 120, *154*
Jones, E. B. G., 34, 35, 36, 37, *46*, 133, *154*
Jones, W., 182, *188*
Jones, W. A., 115, *154*
Jones, W. N., 185, *188*
Jørgensen, E., 57, 76, *80*
Josserand, M., 11, 12, 13, *19*, 51, *80*
Jover, S. G., 167, *188*

K

Kaklamani, E., 72, *81*
Kallio, T., 16, *19*
Kane, J., 98, *153*
Kanzig, J. L., 115, *154*
Karling, J. S., 32, *46*
Kaufman, D. D., 117, 144, *154*
Kauffman, H. R., 84, *154*
Kavanagh, T., 41, *46*
Keay, M. A., 129, *154*
Keefe, A. M., 184, *188*
Keen, N. T., 106, *154*
Keitt, G. W., 38, 39, 42, *46*, 101, 126, *151*, *154*
Kelly, M. S., 61, *80*
Kemp, R. F. O., 42, 45, *46*
Kendrick, E. L., 164, *188*
Kendrick, W. B., 12, 13, *19*, 77, *79*
Kerelo, J. W., 111, *156*
Kernkamp, M. F., 171, 172, *186*
Kerr, N. S., 120, *154*, 169, *188*
Kertesz, Z. I., 61, *80*
Keyworth, W. G., 20, 43, 44, *46*
Khair, J., 40, *46*
Kienholz, J. R., 39, *46*
Kilpatrick, R. A., 25, *45*, 128, *154*, 158, 172, *188*
Kimbrough, J. W., 60, *82*
King, T. H., 96, *153*
Kirilenko, T. S., 27, *46*
Klarman, W. L., 88, *154*
Klausmeier, R. E., 115, *154*
Knapp, C., 87, 149, *152*
Knox, R. B., 52, *80*
Knox-Davis, P. S., 120, *154*
Ko, W. H., 120, *154*
Koch, F. C., 61, *80*
Koch, L. W., 165, *188*
Koch, W. J., 54, 61, 71, *81*, 112, 123, 124, *154*
Kohlmeyer, E., 68, *81*
Kohlmeyer, J., 68, *81*
Kohn, S., 117, *151*
Kommedahl, T., 21, 31, *46*, *47*
Kondo, W. T., 169, 181, 182, 183, *188*
Koo, C. J., 60, *81*
Korf, R. P., 53, 61, *81*
Kotheimer, J. B., 125, *154*
Kotlaba, F., 53, *81*
Kramer, C. L., 17, *18*, *19*, 36, *47*, 92, 108, *155*, 162, *188*
Kreitlow, K. W., 162, *188*
Krongelb, G. S., 140, *156*
Kuć, J., 111, *156*
Kuehn, H. H., 100, *154*
Kuehner, C. C., 121, *154*
Kuhl, J. L., 149 *157*
Kuhlman, E. G., 100, 113, *154*
Kunz, L. J., 128, *152*
Kurtzman, R. H., 90, *154*
Kwon-Chung, K. J., 144, *154*

L

Laane, M. M., 60, *81*
La Brijn, J., 84, *154*
La Cour, L. F., 61, *79*
Lacy, M. L., 101, *154*
Lai, P., 25, *45*
Lambert, E. B., 43, *46*, 90, *154*
Lamey, H. A., 111, 143, *156*
Lange, B. J., 166, *188*
Lange, M., 121, *154*
Langeron, M., 52, 53, 61, 65, 66, 69, 71, *81*, 92, 97, 100, 102, 107, 118, 128, 134, 135, 137, 140, *154*
Langford, M. H., 126, *154*
La Rue, C. D., 44, *46*
La Rue, J. I., 11, 12, *19*, 51, *81*
Last, F. T., 169, *188*
Latch, G. C. M., 58, *81*
Latham, A. J., 101, *154*
La Touche, C. J., 29, *46*
Latourelle, P., 167, *188*
Laundon, G. F., 66, 67, *81*, 182, *188*
Leach, C. M., 38, 43, 44, *46*, 90, 91, 92, *154*
Leaubie, M., 164, *188*
Leben, C., 58, 59, *79*, *81*
Lellinger, L. H., 178, 179, *188*
Leonian, L. H., 122, 125, 127, *154*
Lepik, E., 56, *81*
Levis, F. H., 164, *189*
Lewis, R. W., 56, 57, 58, *81*
Lidwell, O. M., 17, *18*
Lilly, V. G., 85, 116, 117, 124, 127, 130, *152*, *154*, *155*, *157*
Lindegren, C. C., 61, *81*
Linder, D. H., 65, *81*
Linn, M. B., 101, *154*, 181, 182, *188*

BOTANICAL GARDEN LIBRARY

Little, G. N., 164, *188*
Littman, M. L., 122, *154*
Littrell, R. H., 112, *154*
Llanos, C. M., 124, *154*
Lloyd, A. O., 48, *81*
Lock, W., 161, *189*
Lockwood, J. L., 124, *154*
Loegering, W. Q., 169, 171, 172, 173, *187*, *188*
Loquin, M., 13, *19*, 52, 53, 61, 62, *81*, 122, *154*
Lowe, D., 104, *154*
Lowe, D. P., 10, *19*, 175, *190*
Lowe, E. P., 162, *189*
Lowry, R. J., 61, *81*
Lowy, B., 13, *19*
Lu, B. C., 61, *80*
Lucas, G. B., 132, *153*
Lukens, R. J., 123, *154*
Luteraan, P. J., 74, *81*
Luttrell, E. S., 140, *154*
Lyon, H., 41, *47*

M

Maácz, G. J., 56, *82*
Mabadeje, S. A., 83, *157*
McBride, M. C., 58, *81*
McCallan, S. E. A., 100, *155*
McClemont, J., 88, *157*
McClure, F. W., 13, *19*
McCoy, R. E., 17, *19*
McCracken, F. I., 17, *19*
McCready, R. M., 85, *155*
McCubbin, W. A., 184, *188*
Macdonald, J. A., 75, *81*
McDonald, W. C., 141, *155*
Macer, R. C. F., 170, *188*
Machacek, J. E., 91, *155*
Machlis, L., 123, 124, *155*
McIntosh, D. L., 127, *155*
Mackenzie, D. W. R., 37, *46*
McKittrick, R. T., 56, 57, 58, *81*
McKnight, K. H., 63, *81*
Macko, V., 15, *19*
MacLaren, J. A., 128, *155*
Maclay, W. D., 85, *155*
Maclean, D. J., 149, *157*
McLean, R. C., 44, *46*, 138, *155*
McLennan, E., 33, *46*
Madelin, M. F., 76, *81*, 115, 117, *155*
Maduewesi, J. N. C., 101, *155*
Magoon, C. A., 90, *151*
Mahadevan, A., 142, *155*
Malan, C. E., 75, *81*
Malka, I., 121, *155*
Malone, J. P., 25, 26, *46*
Maneval, W. E., 159, 162, *188*
Manka, K., 30, *46*
Mann, M. P., 48, *79*
Marcelou, U., 72, *81*
Mardsen, D. H., 71, *81*
Mariat, F., 38, *46*
Marlatt, R. B., 56, 57, 58, *81*
Marr, C. D., 61, *80*
Martin, G. W., 14, *19*, 69, 71, *81*
Martin, J. P., 126, *155*
Martin, S. M., 160, *188*
Martinson, C., 28, *46*
Martoja, R., 53, *81*
Martoja-Pierson, M., 53, *81*
Marx, A., 87, *155*
Mathison, G. E., 32, *47*
Mathur, R. S., 130, *155*
Mathur, S. B., 183, *190*
Matthews, F. R., 170, *189*
May, K. R., 17, 18, *19*
May, O. E., 116, *155*
Mayor, V., 173, 174, *186*
Mazur, P., 159, 163, 169, 171, 173, *188*
Medlar, E. M., 131, *156*
Mehrlich, F. P., 122, *155*
Mehrotra, B. S., 170, *188*
Mello, M. T. de, 173, 174, *186*
Menzies, J. D., 143, *155*
Merz, W. G., 140, *155*
Mesrobeanu, L., 87, *155*
Metrod, G., 61, *81*
Meyer, E., 162, *188*
Meyer, J., 140, *156*
Mihalevskaia, O. B., 57, *81*
Miller, C. E., 35, *46*, 94, 104, *151*, *155*
Miller, H. J., 164, *190*
Miller, J. J., 143, *155*, 165, *188*
Miller, P. M., 147, *155*
Miller, V. P., 93, *156*
Minai, K., 70, *81*
Minami, P. S., 70, *81*
Mitchell, H. K., 131, *157*
Mitchell, J. E., 96, 126, *155*, *156*
Mitter, J. H., 119, *154*
Mix, A. J., 162, *188*
Mobley, C. L., 172, *188*
Moline, S. W., 171, *188*
Moore, E. J., 61, *81*
Moore, M. B., 21, *46*
Moore-Landecker, E., 27, *46*, 90, *155*
Moreau, C., 91, *155*
Moreau, M., 91, *155*
Morgan-Jones, J. F., 60, *81*
Moriber, L., 117, *153*
Morse, L. E., 178, *188*
Morton, D. J., 59, *81*, 89, *155*
Morton, H. E., 87, *155*
Moseman, J. G., 158, 159, *188*
Mosseray, P., 137, *155*
Mowat, W. P., 133, *153*
Moyer, A. J., 116, *155*
Mrak, E. M., 147, *155*
Mueller, K. F., 28, *46*
Mukerji, K. G., 92, *155*
Mundkur, B. B., 102, *155*
Mungelluzzi, C., 167, *186*
Munk, A., 11, *19*, 66, *81*,
Mureșan, E., 53, *81*
Muskett, A. E., 25, 26, *46*
Mussell, H. W., 149, *155*

N

Nadakavukaren, M. J., 93, *155*
Nagel, C. M., 165, *189*
Nag Raj, T. R., 77, *79*
Narasimhan, M. J., 69, *82*, 110, *156*
Nash, S. M. 126, 133, *155*, *156*
Neal, R. W., 143, *155*
Neergaard, P., 183, *190*
Negruțiu, T., 168, 169, *189*
Nelson, G. A., 61, *81*
Nelson, R. R., 142, *153*
Nelson, W. L., 141, *151*
Nene, Y. L., 106, *156*
Nestorescu, N., 87, *155*
Netzer, D., 98, *155*

Neu, J., 85, *152*
Newhall, A. G., 58, *82*
Nicholson, P. B., 58, *80*
Nicolescu, P., 53, *81*
Nicoli, R. M., 167, *188*
Niederpruem, D. J., 140, *155*
Nigam, S. S., 174, *187*
Nilsson, S., 113, *155*
Noble, M., 26, *46*
Nobles, M. K., 125, *155*
Noll, A., 58, *81*
Norris, D., 164, *189*
Novák, E. K., 164, 166, *189*
Nwauzo, E. E., 101, *155*
Nygaard, G., 39, *46*

O

O'Brien, T. P., 53, *80*
Ohms, R. E., 33, *46*
Okafor, N., 101, *157*
Oliver, A. C., 34, *46*
Olsen, O. A., 61, *81*
O'Neill, H., 179, *189*
Onions, A. H. S., 160, 161, 162, 164, 165, 166, 168, 170, 171, 173, 181, *189*
Oppenheimer, C. H., 94, *155*
Ores, R. O., 70, *81*
Orr, G. F., 100, *154*
Orton, P. D., 11, *19*, 51, *80*
Oteifa, B. A., 164, *190*
Ottow, J. C. G., 36, *46*, 92, 108, *155*
Ouellette, G. B., 176, *189*
Owens, H. S., 85, *155*

Ö

Öner, M., 30, *46*

P

Paden, J. W., 33, *46*
Padhye, A. A., 183, *189*
Pady, S. M., 17, *19*, 36, *47*, 92, 108, *155*
Paharia, K. D., 31, *47*
Panzer, J. D., 17, *19*
Papavizas, G. C., 88, 96, 106, 109, 125, 133, 143, 147, *153*, *155*, 172, *188*
Papazian, H. P., 45, *47*
Pappelis, A. J., 109, *155*
Park, D., 35, *47*, 103, 132, *155*
Parkinson, D., 22, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, *47*, 49, *81*
Parmelee, J. A., 185, *189*
Parmentier, G., 166, *189*
Parmeter, J. R., 100, *157*
Parris, G. K., 60, *81*
Pathak, S. G., 95, *153*
Pathak, V. K., 36, *47*, 92, 108, *155*
Pauli, F., 60, *81*
Pavlatou, M., 72, *81*
Payen, J., 32, *47*
Peacock, H. A., 53, *81*
Peers, D. J., 143, *155*
Peet, C. E., 15, *18*
Pelhate, J., 91, *155*
Pelletier, G., 51, *79*
Perez, C. A. de, 167, *188*
Perring, F. H., 178, *190*
Perrot, P. E., 34, *47*, 133, *155*
Petersen, L. J., 49, *81*
Peterson, J. L., 32, *47*, 104, *152*, 164, *189*
Petrović, M., 179, *189*
Pfister, D. H., 61, *81*
Phaff, H. J., 147, *155*
Phillips, D. J., 133, *155*
Phillips, J. M., 59, *81*
Phinney, H. K., 64, *81*
Pieper, E. J., 116, *155*
Piggott, W. R., 27, *45*
Pigman, W. W., 61, *81*
Pinto, P. V. C., 95, *153*
Pisano, M. A., 118, *155*
Plumb, G. H., 115, *152*
Policard, A., 52, 53, *81*
Pollack, F. G., 160, 181, *187*, *189*
Ponchet, J., 118, *155*
Pontecorvo, G., 134, *155*
Popov, I. S., 173, *189*
Popp, W., 57, 59, *81*
Porter, R. H., 158, *189*
Pouzar, Z., 53, *81*
Povah, A., 161, *189*
Powers, H. R., 158, 159, *188*
Poyton, R. O., 94, *153*
Pramer, D., 55, *80*
Price, D., 169, *188*
Price, I. P., 35, *47*
Pugh, G. J. F., 32, *47*, 103, *152*
Punithalingam, E., 8, *19*, 24, *47*
Puntoni, V., 174, *189*
Purushothaman, D., 142, *155*
Purvis, M. J., 53, *82*
Purvis, M. R., 162, *189*

R

Raabe, R. D., 89, *155*
Ragunathan, V., 142, *155*
Raicu, C., 128, *156*
Rajendren, R. B., 149, *152*
Ramalingam, A., 17, *19*
Ranque, J., 167, *188*
Ranzi, F., 184, *189*
Rao, P. R., 26, *47*
Rao, V. R., 92, *155*
Raper, J. R., 91, 137, 140, *156*
Raper, K. B., 21, *47*, 106, 110, 112, 116, 117, 119, 125, 129, 137, *156*, 161, 162, 163, 168, 170, 174, *187*, *189*
Rapilly, F., 23, 24, 25, 26, *47*, 53, 55, 65, *82*, 85, 92, 102, 118, 125, 129, 132, 134, 140, 146, *156*, 184, 185, *189*
Raulin, J., 137, *156*
Rautella, G. S., 102, *156*
Rawlins, T. E., 61, *82*
Rawson, A. J., 15, *19*
Ray, J. N., 85, *156*
Reewe, R. M., 61, *82*
Reid, C. P. P., 90, *156*
Reischer, H. S., 97, 138, 149, *156*, 164, *189*
Reiss, J., 61, 75, 76, *82*
Remsberg, R. E., 90, *156*
Reynolds, G., 161, *189*
Rhoades, H. E., 170, *189*
Rhodes, M., 166, *189*
Rich, A. E., 159, *189*
Richards, G. S., 138, *156*
Richter, A., 184, *189*
Ridell, R. W., 72, *82*
Rigler, N. E., 86, *156*
Riker, A. J., 24, *47*, 53, *82*, 86, 87, 92, 102, 111, 127, 132, 134, 136, *156*, 185, *189*
Riker, R. S., 24, *47*, 53, *82*, 86, 87, 92, 102, 111, 127, 132, 134, 136, *156*, 185, *189*
Rinfert, A. P., 171, *187*, *188*
Rishbeth, J., 55, *82*
Rivalier, E., 74, *82*
Roane, C. W., 165, *189*

Robbins, W. J., 84, 139, *156*, 164, *190*
Roberson, J. A., 170, *187*
Roberts, J. W., 39, 41, *47*
Rodriguez-Kabana, R., 31, *47*
Rogers, J. D., 55, *82*
Rogerson, C. T., 122, *156*
Rollins, R. C., 174, *189*
Romanowski, R. D., 111, *156*
Romeis, B., 53, *82*
Romero, S., 147, *156*
Roncadori, R. W., 170, *189*
Roth, J. N., 60, *82*
Routien, J. B., 93, *156*
Rowe, A. W., 171, *188*
Roxon, J. E., 139, *156*
Roy, B. S., 85, *156*
Royle, D. J., 111, 141, *156*
Ruemmele, M., 10, *19*
Rusan, M., 125, 126, *156*
Rusch, H. P., 107, *152*
Russell, P., 139, *156*
Ryan, F. J., 113, *156*
Rynearson, T. T., 32, *47*

S

Sabouraud, R., 139, *156*
Sachet, M.-H., 8, 10, *19*, 175, 178, 179, 180, 181, 183, *187*
Sackston, W. E., 50, *82*
Salmon, J., 12, *19*
San Antonio, J. P., 172, 173, *189*
Sartory, A., 140, *156*
Sartory, R., 140, *156*
Sasano, K. T., 131, *156*
Sass, J. E., 52, 53, *82*
Sastry, M. L. N., 164, *188*
Satour, M. N., 129, 142, *156*
Savile, D. B. O., 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, *19*, 52, 62, 64, 65, *82*, 175, 179, 180, 183, *189*
Savory, J. G., 26, *46*
Saxena, B. N., 174, 184, *187, 189*
Saxon, R. B., 15, *19*
Scandiffio, M., 162, *189*
Scheffer, R. P., 104, *156*
Scheidau, J. D., 159, *190*
Schein, R. D., 111, *156*, 159, *189*
Schenck, N. C., 17, *19*
Schmid, W. E., 109, *155*
Schmidt, J. J., 171, *188*
Schmitt, C. G., 172, *186*
Schmitthenner, A. C., 131, *157*
Schmitthenner, A. F., 91, 111, 138, *153, 156*
Schneider, I. R., 101, *156*
Schonborn, C., 92, *156*
Schoulties, C. L., 96, *157*
Schreurs, J., 24, *47*
Schroeder, H. W., 142, *153*
Schurmann, W., 140, *156*
Schuster, E., 17, *18*
Scott, K. J., 149, *157*
Sechler, D., 17, *18*
Segall, R. H., 58, *82*
Sewell, G. W. F., 29, *47*
Seymour, C. P., 112, *156*
Sharma, B. B., 184, *189*
Sharp, E. L., 168, 170, *189*, *190*
Shaw, G. C., 181, 182, 183, *188*
Shaw, M., 149, *152*
Sheard, J. W., 178, *186*
Sheroishi, K. K., 111, *152*
Shetler, S. G., 174, 175, *189*
Shimizu, H., 70, *81*
Shipton, W. A., 58, *82*
Shirling, E. B., 127, *156*
Shoemaker, R. A., 56, 61, *82*, 145, *156*
Shoemaker, R. N., 75, *82*
Sideris, C. P., 142, *156*
Silva, E. M. de, 53, 54, 55, *82*
Silva-Hunter, M., 94, 140, *155, 157*
Silverman, W., 58, *82*
Simmons, E. G., 164, *189*
Simmons, S. A., 56, *82*
Simms, H. R., 52, *82*
Singer, R., 13, *19*, 123, 125, *156*
Singh, K. B., 25, *47*
Singh, P., 59, *82*
Singh, R. K., 162, *189*
Singh, R. P., 122, *153*
Singh, R. S., 106, 126, *156*
Singleton, L. L., 149, *156*
Sinski, J. T., 162, *189*
Sisler, H. D., 123, *154*
Skala, J., 43, 44, *47*
Skalický, V., 61, *82*
Skerman, V. B. D., 49, 64, 73, *82*
Skovmand, B., 172, *186*
Skvorţov, S. S., 59, *82*
Sleeth, B., 91, 108, *156*
Sloan, B. J., 93, *156*
Smith, A. C., 174, 175, *189*
Smith, A. H., 11, 12, 13, *19*, 62, *82*
Smith, C. O., 176, *189*
Smith, D. H., 17, *18*, 164, *189*
Smith, F. G., 168, 170, *189*
Smith, F. X., 162, *189*
Smith, G., 49, 50, 54, 55, 64, 65, 66, 68, 72, *80*, *82*, 86, 88, 97, 106, 108, 118, 125, 128, 134, 135, 137, 138, *156*, 161, 162, 182, *187, 189*
Smith, N. A., 184, *187*
Smith, N. R., 143, *156*
Smith, R. S., 161, 173, 174, *189*
Smoot, J. J., 111, 143, *156*
Snell, F. D., 92, *153*
Sneth, B., 127, *155, 156*
Snyder, W. C., 88, 126, 133, 134, *153, 155, 156, 157*, 173, *189*
Sobers, E. K., 112, *156*
Soike, K., 88, *151*
Solel, Z., 158, *190*
Sommereyns, G., 15, *19*
Soper, J. H., 178, *186, 190*
Spalding, D. H., 144, *156*
Sparrow, F. K., 34, 36, *46*, *47*, 94, 95, *154*
Srinivasan, M. C., 110, *156*, 183, *190*
Srivastava, D. N., 164, *188*
Staffeldt, E. E., 168, 170, *190*
Stafleu, F. A., 181, *190*
Stahmann, M. A., 15, *19*
Staley, J. M., 41, *47*
Stamps, D. J., 111, *157*
Staples, R. C., 149, *155*
Stauffer, J. F., 128, *151*
Stavri, D., 87, *155*
Stebbins, M. E., 164, *190*
Steinberg, R. A., 144, *157*
Steiner, G. W., 101, *157*
Stevens, F. L., 49, *82*

Stewart, D. M., 170, *190*
Steyaert, R. L., 69, *82*
Steyermark, J. A., 179, *190*
Stockdale, P. M., 32, 37, *47*, 49, *82*, 140, *157*
Stoddard, E. M., 115, *152*
Stoner, M. F., 144, *157*
Stover, R. H., 25, *47*
Stubbs, J. J., 116, *155*
Sumner, C. B., 117, 144, *154*
Sundstrom, K.-R., 114, *157*
Sussman, A. S., 158, *190*
Sussman, M., 120, *154*
Sutton, B. C., 35, *46*
Swartz, D., 100, 108, *157*
Swift, M. E., 128, *153*
Sykes, G., 85, 87, 88, *157*

T

Tachibana, H., 167, *190*
Takahashi, W. N., 61, *82*
Takashio, M., 96, *157*
Talbot, P. H. B., 35, *47*, 73, *82*
Talboy, P. W., 136, *157*
Tapia, G., 38, *46*
Taschdjian, C. L., 72, *82*, 142, *157*
Tatum, E. L., 130, 131, *151*, *157*
Taubenhaus, J. J., 158, *190*
Taylor, L. D., 13, *19*
Teitell, L., 128, *151*
Teodorescu, G., 87, *155*
Terakawa, H., 11, *19*
Tervet, I. W., 15, *19*
Tesch, R. B., 159, *190*
Theil, C. C., 88, *157*
Thirumalachar, M. J., 69, *82*, 110, *156*
Thom, C., 119, 144, *157*, 162, *189*
Thomas, R. C., 61, *82*
Thompson, H. C., 88, *157*
Thornton, R. H., 26, 29, *45*, *47*
Thurston, H. D., 111, 127, *157*
Tiba, Y., 70, *81*
Tiffney, W. N., 92, *151*
Timnick, M. B., 124, *157*
Titsworth, E. H., 131, *157*
Tochinai, Y., 145, *157*
Toma, M., 11, 12, *18*
Tomsoff, W. J., 121, *157*
Traub, H. P., 178, *190*
Trevan, J. W., 185, *188*
Tribe, H. T., 32, *47*, 67, *82*, 83, *157*
Trione, E. J., 145, 146, *157*
Trujillo, E. E., 126, *156*
Tsao, P. H., 93, 126, 136, *152*, *157*
Tschirsch, M., 57, *80*, 117, *153*
Tschudy, R. H., 64, *82*
Tu, C. C., 60, *82*
Tucker, G. W., 90, *154*
Tuite, J., 38, 39, 43, 44, *47*, 54, 58, 60, 61, 66, 67, 69, *82*, 84, 86, 87, 88, 92, 93, 101, 106, 119, 121, 122, 133, 136, 141, 145, 150, *157*, 160, 168, 171, *190*
Tullis, E. C., 17, *19*
Turel, F. L. M., 146, 149, *157*
Tyner, L. E., 92, *157*

U

Uden, N. van, 36, *45*
Ulken, A., 36, *47*, 94, *157*
Ullstrup, A. J., 101, 121, *154*, *155*
Urban, Z., 61, *82*
Urlaub, G. S., 103, 106, *152*

V

Vaćzy, C., 181, *190*
Vágás, E., 56, *82*
Van Arsdel, E. P., 17, *19*
Vanbreuseghem, R., 32, *47*, 53, 61, 65, *81*, 92, 96, 97, 100, 102, 107, 118, 128, 134, 135, 137, 140, *154*, *157*
Veldkamp, H., 32, *47*
Verona, O., 162, *190*
Villanueva, J. R., 106, *151*
Vischniac, H. S., 94, *157*
Vogel, H. J., 148, 149, *157*
Voronina, E. G., 61, *80*

W

Waid, J. S., 24, 32, *46*, *47*
Waite, B. H., 25, *47*
Waksman, S. A., 30, *47*, 92, 149, *157*
Walker, E. H., 8, *19*
Walker, J. C., 104, *156*
Walkes, A. C., 72, *79*
Wall, D., 53, *82*
Waller, S., 66, 71, *79*
Walseth, C. S., 103, *157*
Warcup, J. H., 24, 27, 30, 33, *47*, 106, *157*
Watling, R., 11, 12, *19*, 51, 54, 62, *79*, *80*, *82*
Watson, R. D., 31, 34, *46*, *47*, 89, 101, 118, *157*
Weary, P. E., 106, *157*
Weaver, E. A., 87, *157*
Weaver, L. O., 159, *187*
Weiss, F. A., 164, 166, 168, *190*
Weitzman, I., 94, *157*
Wellman, A. M., 172, *190*
Wellman, F. L., 85, *157*
Wellman, R. H., 100, *155*
Wells, P. A., 116, *154*
Welsch, M., 12, *19*
Weltzien, H. C., 58, *79*
Wenham, H. T., 78, *80*
Wensley, R. N., 33, *47*
Wenzl, H., 49, *82*
Wernham, C. C., 40, *45*, 164, *190*
Westerdijk, J., 160, *190*
Westergaard, M., 131, *157*
Weston, W. H., 55, 65, *82*, 163, 164, 170, 183, *186*, *187*, *190*
Weststeijn, G., 101, *157*
White, N. H., 58, *82*
White, W. L., 162, *190*
Whitehead, M. D., 111, 141, *152*, *157*
Whitmore, T. C., 179, *190*
Whitney, H. S., 100, *157*
Wickerham, L. J., 110, *153*
Widden, P., 32, *45*
Wilcoxon, F., 100, *155*
Wilcoxon, R. D., 29, *47*

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

Wilhelm, S., 25, *47*, 89, *155*, 158, 161, 162, *190*
Williams, L. E., 117, 131, 144, *154*, *157*
Williams, L. F., 111, *152*
Williams, P. G., 149, *157*
Williams, S. T., 22, 26, 27, 28, 31, 32, 33, *47*, 49, *81*
Willinson, R. S., 184, *190*
Willoughby, L. G., 34, *47*
Wills, W. H., 99, 128, 144, *157*
Wismer, C. A., 184, *190*
Wittmann, W., 66, *82*
Wood, F. A., 29, *47*
Woodbury, W., 15, *19*
Woods, R., 98, *157*
Worley, C. L., 54, *79*
Wright, J. E., 62, *82*

Y

Yang, C. Y., 96, *155*, *157*
Yarwood, C. E., 150, *153*, *157*
Yaw, K. E., 141, *157*
Yeoman, M. M., 113, *153*
Young, H. C., 149, *156*
Young, R. A., 127, *152*

Z

Zeiders, R. W., 123, *153*
Zentmyer, G. A., 134, *157*
Ziller, W. G., 10, *19*, 175, *190*
Zinkernagel, H., 87, *157*
Zobell, C., 94, *155*
Zoberi, M. H., 73, *82*

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Index de subiecte

A

Absidia, 33
Acarieni,
  în culturi, 172
  combatere, 173, 174
Acetat de celuloză, preparate microscopice cu, 49
Acetat de polivinil, etanşarea preparatelor cu, 67
Acetat de vinil, etanşarea preparatelor cu, 66
Achlya ambisexualis, mediu pentru studierea sexualităţii, 137
Acid lactic, preparate microscopice în, 65
Acid periodic — Schiff, colorări în, 56
Acid picric, colorări diferenţiale cu, 57, 58
Acremonium, mediu pentru cultivare, 118
Acromicetină, purificarea culturilor cu, 92
Actinomycetes, izolarea hifelor de, 44
Adezivul Haupt, 59
Aer,
  captarea sporilor din, 16
  îndepărtarea din preparate microscopice, 63
Agar,
  agent solidificare medii, 84
  dizolvare, 86
  înlocuitori, 85
  Kobe, 132, 135
  purificare, 84
  recuperare, 85
Agaricaceae,
  micorizice, mediu pentru cultivare, 123
  nemicorizice, mediu pentru cultivare, 125
Agaricales,
  colectare, 11, 14
  colorare, 61
  în herbar, 176
  preparate muzeu, 185
  teste chimice, 62
Agaricus bisporus,
  conservare în azot lichid, 172
  mediu de cultură din carpofori de, 100
Agenţi solidificare medii, 84
Ahnfeltia, producător de agar, 84
Albastru de anilină,
  colorări diferenţiale cu, 56, 57, 58, 59
  colorări nuclei cu, 60
Albastru de anilină acid, vezi bleu coton.
Albastru de metil, colorări diferenţiale cu, 58
Albastru de tripan, vezi trypan blue.
Alcool-agar, formula mediului, 93
Alcool polivinilic, preparate microscopice în, 70
Allium cepa, colorarea ciupercilor în, 58, 59
Allomyces,
  mediu pentru cultivare, 110
  mediu pentru studierea nutriţiei, 123
Alphacel, formula mediului, 93
Alternaria alternata, contaminat pe seminţe, 25
A. brassicae, mediu pentru sporulare, 141
A. solani, mediu pentru sporulare, 123, 134
A. tomato, mediu pentru sporulare, 148
American Sabouraud — agar, formula mediului, 130
Amidon, colorări, 61
Amidon-agar, formula mediului, 94
Amidon de porumb, înlocuitor agar, 85
Amann, prepararea lactofenolului, 65
Anagasta kühniella, dăunător în herbare, 178
Anelaţii, colorări, 61
Aneurină, mediu pentru testare, 116
Anthracobia, mediu pentru cultivare, 139
Anthrencis scrophulariae, dăunător în herbare, 178
Antibiotice, purificare culturilor cu, 92
Apa,
  în medii de cultură, 84
  preparate microscopice în, 66
Apă de mare, formula mediului, 94, 95
Apă de mare artificială, formula mediului, 95
Apă distilată, conservarea ciupercilor în, 167
Apă dulce, izolarea ciupercilor din, 34
Apă de robinet — agar, formula mediului, 95
Ape poluate, izolarea ciupercilor din, 36
Aphanomyces, mediu pentru fructificare, 110
A. euteiches,
  formula mediului, 96
  mediu pentru fructificare, 124
A. raphani, mediu pentru conservare şi fructificare, 138
Aphyllophorales,
  în herbar, 176
  preparate muzeu, 185
Arachis hypogaea, mediu de cultură cu, 120
Araldită, etanşarea preparatelor microscopice cu, 67

Armillariella mellea, mediu pentru demonstrarea luminiscenței, 134
Armstrong, formula mediului, 96
Arthrinium, mediu pentru cultivare, 119
Ascochyta, colorare în țesutul gazdei, 58
A. pinodella, mediu pentru sporulare, 134
A. pinodes, mediu pentru sporulare, 134
Ascodesmis, mediu pentru cultivare, 139
Ascomycetes,
colectare, 8
colorare nuclei, 60
colorări diferențiale, 61
conservare, 160
izolare din apă, 34, 35
izolare de pe plante, 23
izolare din sol, 27, 33
izolarea sporilor din sol, 33
mediu pentru cultivare, 110, 122
mediu pentru fructificare, 105
mediu pentru izolare, 94
preparate microscopice, 69
teste microchimice, 61
Ascomycotina, ciuperci acvatice din, 34
Aspergillus,
colorare nuclei, 60
colorări diferențiale, 60
conservare la 5°, 162
conservare prin deshidratare, 166
conservare prin liofilizare, 170
izolări monosporale, 42
mediu pentru cultivare, 114
mediu pentru identificare, 106, 125
mediu pentru izolare, 112
mediu pentru sporulare, 106, 119, 125, 133
mediu pentru formarea cleistoteciilor, 119
A. flavipes, mediu pentru identificare, 129
A. flavus, mediu pentru izolare, 98
A. glaucus,
mediu pentru formarea cleistoteciilor, 110
mediu pentru izolare, 125
mediu pentru sporulare, 106, 110, 117, 125
A. janus, mediu pentru identificare, 129
A. nidulans, mediu pentru formarea cleistoteciilor, 106, 134
A. niger,
mediu pentru cultivare, 118, 137, 144
mediu pentru studiul nutriției, 144
mediu pentru sporulare, 116
A. restrictus, mediu pentru izolare, 125
A. sparsus,
mediu pentru identificare, 129
mediu pentru sporulare, 112
Asthana & Hawker, formula mediului, 96
Azot lichid, conservarea ciupercilor în, 170

B

Badcock, formula mediului, 96
Balsam de Canada,
etanșarea preparatelor microscopice cu, 66, 67, 69
preparate microscopice în, 69
Balsam sintetic, preparate microscopice în, 69
Barnes — agar, formula mediului, 97
Barnett, formula mediului, 97
Basidiomycetes,
colorarea formațiunilor „în cîrlig", 61
colorare nuclei, 60
conservare sub ulei, 164
izolare din sol, 27
mediu pentru cultivare, 96, 125, 139
mediu pentru izolare, 139
mediu pentru sporulare, 101
teste microchimice, 61, 62
Basidiomycotina, viabilitate naturală, 158
Berberis vulgaris, colorarea ciupercilor în, 57
Bere (must) — agar, formula mediului, 97
Berlese, preparate microscopice în mediul, 69
Beta vulgaris, colorarea ciupercilor în, 58
Bhargava, formula mediului, 97
Bilai, formula mediului, 98
Bilă de bou — agar, formula mediului, 98
Bismark brown, colorări diferențiale cu, 58
„Black light",
inhibarea bacteriilor cu, 92
stimularea sporulării cu, 26, 91, 120, 161
Blakeslee, formula mediului, 125
Blastocladiella, mediu pentru cultivare, 99
Bleu coton,
colorarea citoplasmei cu, 53
colorări diferențiale cu, 56, 58
Bleu coton în acid acetic, colorarea citoplasmei cu, 53
Bleu coton în acid lactic, colorarea citoplasmei cu, 53
Bleu coton în lactofenol, colorarea citoplasmei cu, 53
Boletaceae,
micorizice, mediu pentru cultivare, 123
nemicorizice, mediu pentru cultivare, 125
Boletus, deshidratare, 13
Bonner — Addicott, formula mediului, 98
Botran, formula mediului, 98
Botrytis,
colorare în țesuturile gazdei, 58
formula mediului, 98
B. alii, mediu diferențial, 98
B. cinerea, mediu diferențial, 98
BPSMA, formula mediului, 112
Brain-heart-infusion-agar, mediul, 140
Brassica, capcane pentru izolare cu semințe de, 35
B. napus, medii de cultură cu, 129, 142
Bremia lactucae, colorare în țesuturile gazdei, 56, 57, 58
Brown — agar, formula mediului, 99

C

Caloză, colorare, 61
Cameră umedă,
descriere, 20, 75
pentru izolarea ciupercilor de pe semințe, 26
Candida albicans,
mediu pentru identificare, 98, 128, 142
mediu pentru izolare, 128
C. tropicalis, mediu pentru izolare, 128
Cantino (PYG) — agar, formula mediului, 99
Capcane, metodă izolare,
izolarea ciupercilor fitopatogene cu, 32
izolarea ciupercilor acvatice cu, 34
izolarea ciupercilor din sol cu, 32
Capcane pentru spori, 16, 17
Captarea sporilor din aer, 16
Captatoare „de impact", pentru spori, 17
Carboximetilceluloză — agar, formula mediului, 104
Carlile, formula mediului, 99
Carmin, colorarea nucleilor cu, 59
Carmin acetic, colorarea nucleilor cu, 60
Carne (extract) — agar, formula mediului, 99
Carne de vacă — agar, formula mediului, 100
Carpofori, formula mediului cu, 100
Cartof — agar, formula mediului, 100
Cartof — dextroză agar, formula mediului, 100
Cartof — malț — agar — celuloză, formula mediului, 101
Cartof — morcov — agar, formula mediului, 102
Cartof — sucroză — agar, formula mediului, 102
Cărbune de lemn, formula mediului, 99
Ceapă — asparagină — agar, formula mediului, 102
Celofan, cultivarea ciupercilor pe, 71
Celofan adeziv,
captarea sporilor cu, 17
examinarea ciupercilor cu, 48
examinarea culturilor de ciuperci cu, 50
izolarea ciupercilor de pe frunze cu, 24
Celuloză,
colorări, 61
formula mediului, 102
Celuloză — asparagină — agar, formula mediului, 103
Celuloză — Czapek — agar, formula mediului, 103
Celuloză — extract drojdii — agar, formula mediului, 103
Centrifugare, izolarea ciupercilor din sol prin, 33
Cephalosporium gramineum, izolare, 25
Ceratocysis fagacearum,
conservare, 164
mediu pentru formare peritecii, 97
mediu pentru identificare, 97
mediu pentru izolare, 97
mediu pentru sporulare, 131
C. ulmi, mediu pentru izolare, 101, 147
Cercospora,
colorare în țesuturi, 57
conservare, 162
izolare, 20
mediu pentru sporulare, 128
C. beticola,
mediu pentru sporulare, 134
viabilitate naturală, 158
C. kikuchii, viabilitate naturală, 158
Cercosporella herpotrichoides, mediu pentru sporulare, 141
Cercosporidium graminis, mediu pentru sporulare, 119, 123
Cereloză — azotat de amoniu, formula mediului, 104
Chaetomiaceae, mediu pentru formarea periteciilor, 102
Chaetomium,
mediu pentru conservare, 120
mediu pentru cultivare, 102, 110
mediu pentru izolare, 93
C. globosum, mediu pentru sporulare, 103, 106
Chitină, colorări, 61
Chlorazol black E, colorant citoplasmă, 54
Chondrus, producător de agar, 84
Christensen, formula mediului, 122
Chytridiales,
izolare din apă, 34
mediu pentru cultivare, 104
mediu pentru izolarea zoosporilor, 104
Cicer arietinum, mediu de cultură cu, 129
Cimentul Thorner, etanșarea preparatelor microscopice cu, 67
Cireșe — agar, formula mediului, 105
Cistide, colorări, 61
Ciuperci acvatice,
izolare, 34
mediu pentru izolare, 131
Ciuperci antagoniste,
izolare din sol, 33
mediu pentru izolare, 109
Ciuperci din ape poluate, mediu pentru izolare, 130
Ciuperci din ape reziduale, mediu pentru izolare, 130
Ciuperci cărnoase, colectare, 11
Ciuperci celulozolitice,
izolare, 32, 36
mediu pentru izolare, 103, 104
mediu pentru testarea activității, 103, 110
Ciuperci chitinolitice, izolare, 32
Ciuperci coprofile, mediu pentru cultivare, 108

Ciuperci fitopatogene,
colectare de pe plante, 15
colectare spori din aer, 18
preparate pentru muzeu, 184
Ciuperci foliicole,
colectare, 8
izolare, 23, 24
Ciuperci keratinofilice, izolare, 32, 36
Ciuperci lignicole, colectare, 14
Ciuperci nematodofage, mediu pentru izolare, 121
Ciuperci parafinolitice, izolare, 32
Ciuperci pe ramuri şi tulpini, colectare, 11
Ciuperci pe seminţe, mediu pentru izolare, 111, 145
Ciuperci din sol,
examinare, 49
izolare, 26
mediu pentru izolare, 101, 117, 126, 131, 147
Ciuperci din spută, mediu pentru izolare, 108
Ciuperci în ţesuturi vegetale, examinare, 49
Ciuperci zoopatogene,
colectare, 14
conservare, 159
izolare, 37
mediu pentru izolare, 122
Clarite, preparate microscopice în mediul, 70
Claussen — agar, formula mediului, 105
Clavariaceae, colectare, 11
Cloral — fenol, preparate microscopice în, 69
Cloral — lactofenol, preparate microscopice în, 65
Cloramfenicol, bactericid în medii, 92
CMC, formula mediului, 104
Coccidioides, conservare, 162
Codurile herbarelor, 177
Coelomycetes,
conservare, 160
izolare, 23
Colectare,
echipament, 7, 11
probe ape poluate, 36
spori din culturi, 15
spori de pe plante, 15
Colectoare-ciclon, 15
Colecţii de preparate, 183
Coli de herbar, 176
Colletotrichum coccodes, mediu pentru producerea de scleroţi, 131
C. lindemuthianum, mediu pentru sporulare, 111, 130
C. musae, mediu pentru sporulare, 117
C. orbiculare, mediu pentru sporulare, 112
Colofoniu, etanşarea preparatelor microscopice, cu, 66
Colonii, izolare, 44
Colorare,
citoplasma, 53
ciuperci în preparate integrale, 58
ciuperci în secţiuni incluzionate, 55
ciuperci în secţiuni neincluzionate, 56
ciuperci în ţesuturile gazdei, 55
nuclei, 59,
nuclei dermatofiţi, 59
pereţi celulari, 53
Colorări diferenţiale, 55, 56, 57, 58, 60
Componentele mediilor de cultură, 83
Congelare, conservare prin, 162
Conidiogeneză, observarea continuă, metode, 77
Coniothyrium fuckelii, mediu pentru izolare şi sporulare, 134
C. pirinum, mediu pentru sporulare, 105
Conn — agar, formula mediului, 105
Conservarea ciupercilor,
prin deshidratare, 165
în apă distilată, 167
în azot lichid, 170
prin liofilizare, 167
în sol, 164
macromicete, 12
sporilor, 166
prin transfer periodic, 160
sub ulei, 163
Conservarea tipurilor în herbare, 181
Contaminanţi la suprafaţa plantelor, eliminare, 21
Coprinus,
deshidratare, 13
mediu pentru cultivare, 107, 121
preparate pentru muzeu, 185
C. lagopus, mediu pentru fructificare, 115, 117
Corticium praticola, mediu pentru formarea bazidiilor, 143
Cosicov, metodă izolări monosporale, 41
Cotton blue, vezi bleu coton.
Crabill, formula mediului, 105
Crataegus, izolarea ciupercilor din apă cu fructe de, 34
Cromozomi, colorări, 61
Cronartium, colorare în ţesuturile gazdei, 57
C. fusiforme, liofilizare, 170
Cruciferae, colorarea ciupercilor în ţesuturile de, 57
Culturi de ciuperci,
conservare, 158
examinare, 49, 71
incubare, 90
protecţie, 173
purificare, 91
Culturi pe frunze detaşate, 150
Culturi pe lame şi lamele, 72
Culturi de referinţă,
pe celofan, 182
ca tipuri nomenclaturale, 181
uscate, 181

Culturi stoc, 169
Culturi pe suporturi transparente, 71
Culturi vechi, reactivare, 161
Cupressus, colorare ciuperci în țesuturi de, 57
Czapek — agar, formula mediului, 105, 106, 107
Czapek — Dox, formula mediului, 106

D

Dactylis glomerata, mediu de cultură cu, 119
Dade, metodă microcultură, 73
Dammar, rășină pentru etanșarea preparatelor, 66
Daniel & Rusch, formula mediului, 107
Darley, izolator pentru spori, 43, 44
Decolorarea țesuturilor 58
Dejecții de animale — agar, formula mediului, 107
Dejecții de cal, formula mediului, 107
Dejecții de iepure, formula mediului, 107
Dejecții de oaie — agar, formula mediului, 108
Dermatofiți,
conservare, 166, 167
izolare, 37
mediu pentru conservare, 118, 140
mediu pentru cultivare, 100, 106, 140,
mediu pentru izolare, 122, 140
mediu pentru sporulare, 96
Dermocystidium, mediu pentru cultivare, 118
Deshidratare,
metodă conservare culturi, 165
metodă izolare ciuperci din sol, 33
Deuteromycotina,
colectare, 8
mediu pentru cultivare, 122, 132
Deuteromacetes,
colorare nuclei, 60
Dextroză — agar, formula mediului, 108
Dextroză — extract drojdii, formula mediului, 108
Dextroză — fitonă — aereomicină — roz bengal, formula mediului, 108
Dextroză — peptonă — extract drojdii, formula mediului, 109
Dezinsectizarea materialelor de herbar, 178
Diaporthe, conservare, 165
Dick — agar, formula mediului, 109
Diferențiere ciuperci în țesuturi,
preparate integrale, 58
secțiuni în materiale incluzionate, 55
secțiuni în materiale neincluzionate, 56
Diluție, metodă,
izolare, 21
izolare ciuperci din sol, 27, 30
Dioscorea, înlocuitor al cartofilor în medii, 101
Diplocarpon earlianum, mediu pentru sporulare, 112
Dipodascus uninucleatus, mediu pentru studierea nutriției, 117
Discomycetes,
colorare spori, 53
izolare din sol, 27
Dispersia particulelor de sol, metodă izolare, 30
Doetschman, preparate microscopice în mediul, 69
Dopuri pentru eprubete, 86, 87
Dox — agar, formula mediului, 109
DPYA, formula mediului 109
Drechslera, mediu pentru sporulare, 145
Drojdii (extract), formula mediului, 109
Drojdii (extract) — amidon solubil, formula mediului, 110
Drosophila, izolare ciuperci din apă cu capcane din, 34
Dulapuri pentru herbar, 175

E

Echipament pentru colectare, 7, 11
Edgerton, metodă izolări monosporale, 39
Elemente minerale în medii de cultură, 84
Eliminarea contaminanților de pe țesuturile plantelor, 21
Elliott — agar, formula mediului, 110
Emerson, formula mediului, 110
Endogone, colorare în țesuturile gazdei, 58
Entomophthora, mediu pentru cultivare, 140
E. muscae, mediu pentru cultivare, 110
Entyloma dahliae, colorare nuclei, 60
Eozină, colorări diferențiale cu, 57
Ephistia cautella, dăunător în herbare, 178
Epon, rășini pentru montarea preparatelor microscopice, 70
Eprubete pentru conservarea culturilor, 161
Eremascus, mediu pentru fructificare, 119
E. albus, mediu pentru sporulare, 125
Eremothecium ashbyi, mediu pentru cultivare, 141
Eritrozină, colorări diferențiale cu, 57
Erysiphaceae,
colectare, 8
colorare, 55
cultivare, 150
examinare, 49
Erysiphales, culturii pe frunze detașate, 150
Erysiphe betae, colorare în țesuturile gazdei, 58

E. graminis,
captarea conidiilor din aer, 18
colorare în ţesuturile gazdei, 58
conservare, 151
viabilitate naturală, 158
Etanşarea preparatelor microscopice, 66
Etichete pentru eprubete, 161
Etichete permanente pentru herbar, 7, 177
Euparal, preparate microscopice în, 70
Evidenţa în herbare, 177
Examinarea culturilor de ciuperci, 49—51, 71
Examinarea ciupercilor,
microscopice, 48
din sol, 49
pe suprafaţa substratului, 48
în ţesuturi, 49
Examinarea macromicetelor, 51
Exobasidium, mediu pentru studierea fiziologiei, 114

F

Farrant, preparate microscopice în mediul, 69
Fasole-agar, formula mediului, 111
Fasole lima, medii de cultură cu, 111
Fast green, colorări diferenţiale cu, 57
Faure, preparate microscopice în mediul, 69
Făină de porumb, înlocuitor al agarului, 85
Filofloră, izolarea ciupercilor din, 24
Filtrare, izolarea ciupercilor din apă prin, 35
Fitonă-dextroză-agar, formula mediului, 112
Fîn(extract)-agar, formula mediului, 112
Fîn(infuzie)-agar, formula mediului, 112
Flageli, colorare, 61
Flentje, formula mediului, 143
Flentje modificat, formula mediului, 100
Floxină, colorarea citoplasmei cu, 54
Fomes annosus,
formula mediului, 113
mediu pentru sporulare, 101
Fothergill, formula mediului, 113
Freezing-agar, formula mediului, 100
Fries, formula mediului, 113
Fries modificat, formula mediului, 113, 114
Frunze detaşate, culturi pe, 150
Fucsină,
colorarea citoplasmei cu, 54
colorări diferenţiale cu, 59
Fucsină acidă,
colorarea citoplasmei cu, 54
colorări diferenţiale cu, 58
Fucsină bazică, colorarea nucleilor cu, 60
Fucsină bazică-acid tanic, colorarea citoplasmei şi pereţilor celulari cu, 54
Fumago vagans, viabilitatea naturală, 158
Fumigarea materialelor de herbar, 178
Fungi imperfecti, izolare din sol, 27
Fusarium,
colorare în ţesuturile gazdei, 56
conservare, 162, 165
izolare din sol, 28
mediu de cultură, 101, 102, 116, 119, 131
mediu pentru izolare, 96, 105, 106, 132
mediu pentru formarea periteciilor, 134
mediu pentru sporulare, 96, 98
F. graminearum, mediu pentru sporulare, 104
F. oxysporum
mediu pentru izolare, 106
mediu pentru sporulare, 132, 145
F. oxysporum f. sp. *lycopersici*
mediu pentru cultivare, 104
mediu pentru sporulare, 115
F. solani, mediu pentru izolare, 106

G

Gaeumannomyces graminis
culturi mixte, 91
mediu pentru cultivare, 115
Gasteromycetales, colectare, 11
Gazarea materialelor de herbar, 178
Gelidium, producător de agar, 84
Geluri, colorări, 61
Gentamicină, purificarea culturilor cu, 92
Giemsa,
colorare nuclei, 59
colorare nuclei dermatofiţi, 59
Gigartina, producător de agar, 84
Gladiolus, colorarea ciupercilor în, 56
Glicerină, preparate microscopice în, 65
Glicerină gelatinată, preparate microscopice în, 71
Glicerină-agar, formula mediului, 114
Glicogen, colorări, 61
Glucoză, formula mediului, 115
Glucoză-acizi casaminici, formula mediului, 115
Glucoză-alanină-agar, formula mediului, 115
Glucoză-asparagină-agar, formula mediului, 115
Glucoză-asparagină-sterol, formula mediului, 116
Glucoză-azotat-sterol, formula mediului, 116
Glucoză-bere, formula mediului, 116
Glucoză-extract drojdii-agar, formula mediului, 117
Glucoză-hidrolizat de cazeină, formula mediului, 117
Glucoză-peptonă-agar, formula mediului, 117
Glyceel, vezi cimentul Thorner.

Goldstein & Moriber, formula mediului, 117
Glacilaria, producător de agar, 84
Graminee, cultivarea ciupercilor pe frunze detașate de, 150
Graminee (frunze) — agar, formula mediului, 119
Gray & Wess, preparate microscopice în mediul, 70
Grigoraki, formula mediului, 118
Grîu(embrioni)-agar, formula mediului, 118
Grîu(făină)-agar, formula mediului, 118
Grîu(paie)-agar, formula mediului, 118
Guignardia laricina, mediu pentru sporulare, 110
Guma arabică,
- etanșarea preparatelor microscopice cu, 66
- înlocuitor sucroză în medii, 106, 118
- formula mediului, 118
- preparate microscopice în, 68

Gurr, preparate microscopice în mediul, 70

H

Hanna, metodă izolări monosporale, 40
Hansen, formula mediului, 119
Hansen, metodă izolări monosporale, 44
Hansenula anomala, mediu pentru studierea fiziologiei, 121
Hara-Itô, formula mediului, 110
Harelco, preparate microscopice montate în, 70
Harposporium, mediu pentru cultivare, 117
Harrold, formula mediului, 119
Haupt, adezivul, 59
Hayduk(soluția), formula mediului, 119
Heller, metodă preparare silicagel, 85
Helminthosporium
- colorare nuclei, 60
- conservare, 164, 165

H. carbonum, mediu pentru sporulare, 142
H. oryzae, mediu pentru sporulare, 142
H. turcicum
- mediu pentru formarea periteciilor, 140
- mediu pentru sporulare, 121

H. vagans, mediu pentru sporulare, 123
Hematoxilină,
- colorări diferențiale cu, 57
- colorări nuclei, 60

Herbar,
- construcție, 175
- materiale, 175
- mobilier, 175

Herbarul micologic, tehnici, 174
Herpell, metodă conservare macromicete, 13
Heterobasidiomycetes, viabilitate naturală, 158
Hife,
- izolare, 44
- izolare din sol, 27

Hîrtie de filtru — extract drojdii — agar, formula mediului, 119
Hodgson, formula mediului, 119
Homobasidiomycetes, colorare, 53
Hordeum, colorarea ciupercilor în, 57, 58, 59
Horne & Mitter, formula mediului, 119
Hotson, formula mediului, 119
Hoyer, preparate microscopice în mediul, 68, 69
Hydnaceae, colectare, 14
Hymenomycetes, mediu pentru identificare, 125
Hyphomycetes,
- conservare, 160
- examinare, 49
- examinare culturi, 50, 77
- izolare din apă, 34, 35
- izolare de pe plante, 23
- izolare din ape poluate, 36

Hyphomycetes acvatice, mediu pentru cultivare, 113
Hyphomycetes nematodofage,
- izolare din sol, 33
- mediu pentru cultivare, 124

I

Immersion tubes, metodă izolare ciuperci din sol, 28
Imobilizarea materialelor în preparatele microscopice, 64
Impingers, aparate captat spori, 17
Ingraham modificat, formula mediului, 123
Ingrediente medii, dizolvare, 86
Inocularea mediilor, 89
Inserarea materialelor în herbar, 179
Iod, colorări diferențiale cu, 58
Isaac, preparate microscopice în mediul, 69
Izolarea ciupercilor,
- acvatice, 34
- acvatice, de pe frunze, 35
- acvatice de pe resturi organice, 35
- antagoniste din sol, 33
- din apele dulci, 34
- din apele poluate, 36
- celulozolitice, 32
- chitinolitice, 32
- fitopatogene, 21
- de pe frunze, 23, 24
- keratinolitice, 32
- de pe lemn, 26
- parafinolitice, 32
- de pe rădăcini, 24, 25
- de pe resturi de plante, 25
- de pe semințe, 25
- din sol, 26
- din spuma apelor, 35
- de la suprafața plantelor, 23
- din tuberculi, 23, 25
- din țesuturi profunde, 23
- zoopatogene, 37

Izolarea coloniilor, 44
Izolarea dermatofiților, 32, 37
Izolarea directă, 20
Izolarea directă a hifelor, din sol, 27
Izolarea hifelor, 44
Izolarea levurilor,
din apele dulci, 36
din ape poluate, 37
Izolatoare pentru izolări monosporale, 42
Izolări monosporale, 38
însămînțarea mediilor, 39
prepararea mediilor, 38
prepararea suspensiilor de spori, 38, 39
cu tuburi capilare, 39

Î

Încălzirea preparatelor microscopice, 62
Însămînțarea mediilor pentru izolări monosporale, 39

J

Janus green, vezi verde Janus
Johansen, formula mediului, 105, 125
Jones, formula mediului, 120

K

Kabatiella lini, mediu pentru sporulare, 127
Karo, preparate microscopice în mediul, 71
Kauffman, formula mediului, 120
Kauffman modificat, formula mediului, 121
Keitt, metodă izolări monosporale, 42
Kerr & Sussman, formula mediului, 120
Keyworth, izolator pentru spori, 43, 44
Knop(soluția), formula mediului, 120
Knox — Davis, formula mediului, 120
Ko & Hora, formula mediului, 120
Kobe, agar japonez, 132, 135
Krainsky, formula mediului, 116
Krönig, lut pentru etanșarea preparatelor microscopice, 66
Kuehner, formula mediului, 121

L

Lac pentru unghii, etanșarea preparatelor microscopice cu, 66
Lactofenolul Amann, preparare, 65
Lacto-fucsină, colorarea citoplasmei cu, 54
Lactoză-hidrolizat de cazeină, formula mediului, 121
Lactuca sativa, colorarea ciupercilor în, 56, 57, 58
Lambert, izolator pentru spori, 43
Lame capcane, izolarea ciupercilor din sol cu, 29
Lame gelozate, culturi pe, 74
Lame microscopice, curățire, 62
Lamela dublă, preparate microscopice cu, 67, 68
Lamela dublă modificată, preparate microscopice, 67, 68
Lamele, curățire, 62
Lange, formula mediului, 121
Lapte-agar, formula mediului, 121
Lasioderma sericorne, dăunător în herbare, 178
Lee, preparate microscopice în mediul, 69
Legume(ulei)-azotat-agar, formula mediului, 121
Lemn, izolarea ciupercilor de pe, 26
Lens culinaris, medii de cultură cu, 137
Lentinus tuber-regium, mediu pentru fructificare, 100, 143
Leonian-agar, formula mediului, 122, 125
Lepisma saccharina, dăunător în herbare, 178
Leptomitaceae, culturi pe semințe, 142
Levuri,
colorări, 61
conservare, 164
izolare din apă dulce, 36
izolare din ape poluate, 37
liofilizare, 170
mediu pentru cultivare, 118, 119, 125
mediu standard, 122
mediu pentru studierea sexualității, 110
Lichide pentru preparate microscopice, 65
Lichide pentru protecția ciupercilor în timpul liofilizării, 168
Light green, colorări diferențiale cu, 57
Liofilizarea,
macromicete, 13, 185
verificarea liofilizării, 169
Lipide, colorări, 61
Littman, formula mediului, 122
Lophodermium, colorare nuclei, 60
Loquin, formula mediului, 122
Lotus corniculatus, colorarea ciupercilor în, 58
Lucernă(decoct)-agar, formula mediului, 123
Lukens & Sisler, formula mediului, 123
Lupinus polyphyllus, medii de cultură cu, 134
Lutarea preparatelor microscopice, 66
Lutul lui Noyer, 66
Lutz(modificat), formula mediului, 123
Lycopersicum esculentum, colorarea ciupercilor în, 58
Lyposcelis sp., dăunător în herbare, 178

M

Machlis, formula mediului, 123, 124
McIntosh modificat, formula mediului, 127

Macromicete,
examinare, 11, 12
preparate pentru muzeu, 185
Macrophomina phaseolina, mediu pentru sporulare, 120
Maltoză, formula mediului, 124
Maltoză-peptonă, formula mediului, 124
Maltoză-tartrat de amoniu, formula mediului, 124
Malţ(extract)-agar, formula mediului, 124
Malţ(extract)-arginină-acid nicotinic, formula mediului, 125
Malţ(extract)-morcov, formula mediului, 125
Manihot, înlocuitor al cartofului în medii, 101
Manită-agar, formula mediului, 125
Marasmius, deshidratare, 13
Martin, formula mediului, 126
Mastigomycotina,
ciuperci acvatice, din, 34
viabilitate naturală, 158
Mazăre-agar, formula mediului, 127
Mazăre(bulion), formula mediului, 127
Mazăre(seminţe), formula mediului, 127
Măr(decoct de frunze)-agar, formula mediului, 126
Medicago, în medii de cultură, 123
Medii de cultură,
clarificare, 87
componente, 83
inocularea, 89
distribuirea, 86
filtrarea, 87
formule şi reţete, 93—149
păstrarea, 89
prepararea, 85
sterilizarea, 87
tyndalizarea, 88
Melampsora lini
conservare, 159
mediu pentru cultivare, 146, 149
Melanconium fuligineum, mediu pentru sporulare, 124
Melilotus, medii de cultură cu, 134
Meliolineae,
colectare, 8
examinare, 49
Melzer, reactivul, 61
Membrane, colorări, 61
Methyl green in glycerin-jelly, vezi verde de metil în glicerină gelatinată.
Methyl violet, colorări diferenţiale cu, 57
Metoda acului, izolări monosporale prin, 39
Metoda ansei, izolări monosporale prin, 41
Micelii sterile, izolare din sol, 27
Micorize, colorare în ţesuturile gazdei, 59
Microcamere,
pentru cultivare, 74
pentru observarea continuă a conidiogenezei, 77
Microchirurgie, 45
Microculturi pe lame şi lamele, 72
Microelemente(soluţie), formula, 115, 127
Micromanipulatoare, 41, 42
Microspatule pentru izolări monosporale, 42
Microsporum gypseum, mediu pentru fructificare, 142
Microthyriaceae, examinare, 49
Microtoame simple, 52
Miere-peptonă-agar, formula mediului, 128
Minerale, soluţie săruri, 128
Minerale(săruri)-agar, formula mediului, 128
Mitocondrii, colorări, 61
Molibden, formula mediului, 128
Monilinia fructicola, mediu pentru cultivare, 133
M. laxa, mediu pentru cultivare, 133
Monoblepharis, mediu pentru fructificare, 133
Monochaetia, colorare în ţesuturile gazdei, 57
Montarea preparatelor microscopice, 63
Morcov-agar, formula mediului, 128
Moyer, formula mediului, 129
Mucilagii, colorări, 61
Mucor, 33
mediu pentru cultivare, 112
mediu pentru identificare, 129
mediu pentru sporulare, 133
Mucoraceae,
conservare, 162
mediu pentru cultivare, 125
Mucorales,
conservare sub ulei, 164
liofilizare, 170
Musa, colorare ciuperci în, 57
Musca domestica, capcană pentru izolarea ciupercilor acvatice, 34
Muzeu, ciupercile ca preparate de, 184
Mycena, deshidratare, 13
M. polygramma, mediu pentru demonstrarea luminiscenţei, 134
Mycophil-agar, formula mediului, 112
Myxomycetes,
colectare, 14
în herbar, 176
liofilizare, 169
mediu pentru conservare, 122
mediu pentru cultivare, 112, 120, 125
preparate microscopice, 69, 71

N

Nanizzia, mediu pentru fructificare, 144
Napi(seminţe)-agar, formula mediului, 129
Nasturtium officinale, mediu de cultură cu, 147

Năut-agar, formula mediului, 129
Necol mounts,
preparate microscopice, 49
examinarea culturilor, 50
Necoloidină, examinarea ciupercilor în, 49
Negru de clorazol, vezi Chlorazol black.
Neopeptonă-glucoză-agar, formula mediului, 130
Neptonă-roz bengal-aureomicină-agar, formula mediului, 130
Neurospora,
colorare nuclei, 60
formula mediului „complet", 130
formula mediului „minimal", 130
mediu pentru cultivare, 148
N. crassa, mediu pentru studierea fiziologiei, 145
Nevilite, preparate microscopice montate în, 70
Newcomer, lichidul, 59
Nisip-pământ-rădăcini tomate, formula mediului, 131
Note de teren, 7, 11
Noyer, lut pentru etanşarea preparatelor microscopice, 66
Nutramigen-agar, formula mediului, 131
Nylon, izolarea ciupercilor din sol cu, 30

O

OAES, formula mediului, 131
Observarea creşterii şi morfogenezei, 71
Ohio, formula mediului, 131
Orange G, colorarea ciupercilor în ţesuturi cu, 56
Orceină, colorarea nucleilor cu, 60
Orceină acetică, colorarea nucleilor cu, 60
Orseillin BB, colorări diferenţiale cu, 57, 58
Otrăvirea plantelor în herbare, 179
Ou(gălbenuş)-cartof, formula mediului, 131
Ovăz(făină)-agar, formula mediului, 132
Ovăz(fulgi)-agar, formula mediului, 132
Oxid de etilen, sterilizarea mediilor cu, 88
Oxid de propilen,
sterilizarea mediilor cu, 88
sterilizarea suprafeţelor cu, 22
sterilizant pentru conservarea mediilor, 89

P

Panus stipticus, mediu pentru demonstrarea luminiscenţei, 134
Park, formula mediului, 132
Pasteur(soluţia modificată), formula mediului, 132
Patterson, lichidul, 68
Păr, izolarea ciupercilor zoopatogene de pe, 37
PCNB, formula mediului, 132
PDA, formula mediului, 100
Pectice, colorarea substanţelor, 61
Penicilină, purificarea culturilor cu, 92
Penicillopsis, mediu pentru cultivare, 135
Penicillium,
colorare, 60
colorare nuclei, 60
conservare, 162
conservare prin liofilizare, 170
mediu pentru identificare, 106, 107, 125, 138
mediu pentru sporulare, 133
P. glaucum, colorare, 58
P. luteum, mediu pentru formarea cleistoteciilor, 116
Pentaclornitrobenzen, formula mediului, 132
Peridermium, colorare în ţesuturile gazdei, 57
Peronospora parasitica, colorare în ţesuturile gazdei, 57
P. tabacina, conservare, în azot lichid, 172
Peronosporaceae,
colectare, 8
colorare haustori, 57
viabilitate naturală, 158
prelungirea viabilităţii naturale, 159
Peronosporales,
culturi pe frunze detaşate, 150
în herbar, 180
Perrot, formula mediului, 133
Pestalotia, colorare în ţesuturile gazdei, 57
Peşte(bulion), formula mediului, 133
Petri(soluţie minerală), formula mediului, 133
Pezizales,
colectare, 11
preparate pentru muzeu, 185
pH
favorabil pentru creşterea ciupercilor, 90
mediilor, măsurarea, 87
Phaseolus lunatus, medii de cultură cu, 111
Phleum pratense, medii de cultură cu, 119
Phoma lingam, mediu pentru sporulare, 127
„Phycomycetes",
izolare din apă, 34
izolare din ape poluate, 36
mediu pentru cultivare, 132
mediu pentru izolare din apă, 95
Phyllophora, producător de agar, 84
Phymatotrichum omnivorum,
mediu pentru sporulare, 98
viabilitate naturală, 158
Physarum polycephalum, mediu pentru cultivare, 99, 107

Phytophthora,
conservare, 162, 164, 165
cultivare, elemente toxice, 84
izolare din sol, 28
mediu pentru cultivare, 122, 135
mediu pentru izolare, 111, 127, 136
mediu pentru producere de oospori, 111, 129, 142
mediu pentru producere de sporangi, 111, 121, 128, 133, 134
mediu pentru reproducere sexuată, 142
mediu pentru studierea efectului sterolilor, 116
P. capsici, mediu pentru reproducerea sexuată, 142
P. cinnamomi,
mediu pentru formarea sporangilor, 111
mediu pentru reproducerea sexuată, 141
P. fragariae,
mediu pentru formarea sporangilor, 142
mediu pentru formarea zoosporilor, 111
P. ilicis, mediu pentru formarea sporangilor, 127
P. infestans,
izolare, 24, 25
mediu pentru conservare, 111
mediu pentru diferenţierea raselor, 119
mediu pentru producerea de oospori, 111, 143
mediu pentru producerea de sporangi, 111, 127, 141
mediu pentru reproducerea sexuată, 147
mediu pentru studierea nutriţiei, 116
P. megasperma var. *sojae*
mediu pentru conservare, 111
mediu diferenţial, 121
P. palmivora, mediu pentru producerea de sporangi, 147
P. parasitica,
mediu pentru producerea sporangilor, 99, 147
mediu pentru reproducerea sexuată, 142
P. parasitica var. *nicotianae,* mediu pentru producerea de sporangi, 144
P. phaseoli, conservare, 159
P. sojae, mediu pentru producerea de oospori, 111
Pianeze III, colorări diferenţiale cu, 56
Picătură suspendată, microculturi în, 72
Picronigrozină în lactofenol, colorarea citoplasmei cu, 55
Piele, izolarea ciupercilor zoopatogene de pe, 37
Pieper, Humphrey & Acree, formula mediului, 116
Pilobolus, mediu pentru cultivare, 100, 108
Pinus, colorarea ciupercilor în, 57
Piptocephalis, conservare, 162
Pisum sativum, medii de cultură cu, 129
Pîine, formula mediului, 133
Pîine-agar, formula mediului, 134
Plante(fragmente), formula mediului, 134
Plasmopara viticola, colorare în ţesuturile gazdei, 56
Plăci perforate, îngropate, metodă izolare ciuperci din sol, 29
Plicuri de herbar, confecţionare, 176
Polyporaceae,
colectare, 14
colorare în ţesuturile gazdei, 57
Pontecorvo, formula mediului, 134
Poria, colorări, 62
Portocale, formula mediului, 135
Porumb(făină de boabe), formula mediului, 135
Porumb(tulpini), formula mediului, 136
Prelungirea viabilităţii naturale, 159
Preparate integrale, 58
Preparate „in toto", 58
Preparate microscopice,
colecţii de, 183
din culturi, 49, 71
deshidratarea materialelor, 62
etanşarea, 66
imobilizarea materialului în, 63
îndepărtarea aerului din, 62
lichide pentru montare, 63
în medii lichide, 62
în medii care se solidifică, 68
montarea materialelor, 62
operaţii preliminare, 62
restaurarea turgescenţei, 62
Preparate pentru muzeu, 184
Prese de teren, 8, 9
Propiolactonă, sterilizarea mediilor cu, 88
Protecţia culturilor, 173
Prune-agar, formula mediului, 136
Pseudotsuga, colorarea ciupercilor în, 56
Pterocaldia, producător de agar, 84
Puccinia coronata, liofilizare, 170
P. graminis,
colorare în ţesuturile gazdei, 57, 58
conservare la temperaturi scăzute, 159
conservare în azot lichid, 171, 172
conservare prin liofilizare, 168, 170
P. graminis f. sp. *tritici,* mediu pentru cultivare, 149
P. helianthi, mediu pentru cultivare, 149
P. hordei, captarea sporilor din aer, 18
P. recondita f. sp. *tritici,* mediu pentru cultivare, 149
P. striiformis, liofilizare, 170

Purificarea agarului, metode, 84
Purificarea culturilor de ciuperci,
bariere fizice, 91
factori fizici, 91
factori chimici, 92
Pyrenochaeta, mediu pentru diagnosticare, 118
P. terrestris, mediu pentru izolare, 106
Pyrenomycetes,
colectare, 11
preparate microscopice, 64, 66
Pyrethrum, insecticid în herbare, 178
Pyricularia oryzae, mediu pentru sporulare, 142
Pyronema, mediu pentru cultivare, 139
P. confluens mediu pentru cultivare, 105
Pythiaceae, mediu pentru cultivare, 142
Pythium,
conservare, 162, 165
liofilizare, 168, 170
mediu pentru cultivare, 122, 135
mediu pentru izolare, 95, 108, 111, 136, 138
mediu pentru producerea de sporangi, 121, 134
mediu pentru reproducerea sexuată, 129
mediu pentru studierea efectului sterolilor, 116
mediu pentru purificare de bacteriile contaminante, 108
metodă pentru purificarea culturilor, 91
viabilitatea naturală, 158

R

Rabbit Food-Agar, formula mediului, 139
Raper, formula mediului, 137
Raulin(soluţia), formula mediului, 137
Raulin-Dierckx, formula mediului, 137
Raulin-Thom(soluţia), formula mediului, 137
Rădăcini, izolarea ciupercilor din / de pe, 24
Răşini Epon, preparate microscopice în, 70
Răşini fenolice, preparate microscopice în, 66
Răşini naturale,
preparate microscopice în, 68
etanşarea preparatelor cu, 66
Răşini sintetice,
etanşarea preparatelor cu, 66
preparate microscopice în, 70
Reactivarea culturilor vechi, 161
Recuperarea agarului uzat, 85
Rehidratarea ţesuturilor, 51
Reischer, formula mediului, 138
Resorcin blue, colorări diferenţiale cu, 57
Restaurarea turgescenţei în preparatele microscopice, 62
RFA, formula mediului, 139
Rhabdocline, colorare în ţesuturile gazdei, 56
Rhizoctonia,
izolare din sol, 28
mediu pentru sporulare, 134
Rhizoctonia — agar, formula mediului, 138
R. solani,
colorare nuclei, 60
mediu pentru cultivare, 118
mediu pentru izolare, 120
Rhizophagus, mediu pentru cultivare, 142
Rhizopus, contaminat la izolarea altor ciuperci, 101
R. *stolonifer*,
mediu pentru cultivare, 118
mediu pentru studierea fiziologiei, 113, 144
Rhynchosporium, conservare, 165
R. orthosporum, mediu pentru sporulare, 111
R. secalis, mediu pentru sporulare, 111
Rhytisma, colorare nuclei, 60
Richard, formula mediului, 138
Richards, formula mediului, 138
Ridell, metodă microcultură, 72
Ridichi — agar, formula mediului, 138
Robbins & Hervey, formula mediului, 139
Roşu neutru, colorări diferenţiale cu, 58
Roxon & Batra, formula mediului, 139
Roz bengal,
inhibitor bacterii, 92
medii de cultură cu, 93, 98, 108, 126, 130, 143
Russell, formula mediului, 139

S

Sabhi, mediu de cultură pentru dermatofiţi, 140
Sabouraud — glucoză — agar, formula mediului, 139
Sachs — agar, formula mediului, 140
Safranină, colorări diferenţiale cu, 56, 57, 58
Saprolegniaceae,
conservare, 164, 167
mediu pentru cultivare, 98, 138, 142, 149
Sartory, formula mediului, 140
Schiff,
colorări nuclei, 60
colorări diferenţiale, 56
Schizophyllum, formula mediului, 140
S. commune, mediu pentru fructificare, 140
Schopfer, formula mediului, 141
Sclerotinia,
colorare în ţesuturile gazdei, 56
conservare, 162
mediu pentru cultivare, 135

S. trifoliorum, colorare, 60
Sclerotium, mediu pentru formarea bazidiilor, 147
S. rolfsii, mediu pentru cultivare, 99
Scotch — tape, vezi celofan adeziv,
Screened immersion plates, vezi plăci perforate, îngropate.
Secreţii, izolare ciuperci zoopatogene din, 37
Secţionarea,
culturilor, 52
materialelor congelate, 52
materialelor incluzionate, 53
materialelor neincluzionate, 51
Secţiuni „de mînă", 51
Seed stock, metodă conservare, 169
Semînţe,
izolarea ciupercilor de pe, 25
formulele mediilor cu, 141
Septoria nodorum, mediu pentru sporulare, 138
S. passerini, conservare în azot lichid, 175
Serpula lacrymans,
captarea sporilor din aer, 16
mediu pentru cultivare, 146
Shaker, formula mediului, 110
Shear, lichidul lui, 68
Silicagel,
agent solidificare medii, 85
preparare, 85
suport pentru conservarea ciupercilor, 166
deshidratarea ciupercilor cărnoase cu, 13
Skala, izolator spori, 43, 44
Smith & Dawson, formula mediului, 143
Soia-agar, formula mediului, 143
Soil plate, vezi dispersia particulelor de sol.
Sol,
conservarea ciupercilor în, 165
izolarea ciupercilor din, 26
formula mediului, 143
Sol (extract) — agar, formula mediului, 143
Sordaria, mediu pentru fructificare, 119
S. destruens, mediu pentru fructificare, 96
Spalding, formula mediului, 144
Spălarea solului, metodă izolare ciuperci, 31
Spălarea ţesuturilor în vederea izolării ciupercilor, 22
Sphaeropsidales.
mediu pentru cultivare, 122
preparate microscopice, 64
Spore traps, vezi capcane pentru spori.
Sporendonema sebi, mediu pentru cultivare, 133
Spori,
colectare de pe plante, 15
colectare din aer, 16
colectare din culturi, 15
conservare prin deshidratare, 166
Sporograme, 12
Steinberg, formula mediului, 144
Stemphyllium,
colorare în ţesuturile gazdei, 58
conservare sub ulei, 164
S. bolickii, mediu pentru sporulare, 112
S. solani, colorare în ţesuturile gazdei, 58
Sterilizarea,
mediilor, 87
parţială, metodă izolare ciuperci din sol, 33
plantelor, la suprafaţă, 21
sticlăriei, 85
Sterrha bonifata, dăunător în herbare, 178
S. inquinata, dăunător în herbare, 178
Sticlărie, sterilizare, 85
Stoner, formula mediului, 144
Streptomicina, purificarea culturilor cu, 92
Substanţe nutritive în medii de cultură, 83
Substanţe pectice, colorări, 61
Substituenţii agarului, 85
Sucroză — prolină — agar, formula mediului, 145
Sucroză — tartrat şi azotat de amoniu, formula mediului, 145
Surse de azot în medii de cultură, 84
Surse de carbon în medii de cultură, 83
Synchytrium, colorarea sporangilor, 61

Ş

Şelac, etanşarea preparatelor microscopice cu, 66

T

Tarsonemus, acarian în culturi, 173
Tehnici herbar, 174
Teste chemotaxonomice, 61
Teste microchimice, 61
Thelephoraceae, colectare, 14
Thielaviopsis basicola, mediu pentru izolare, 126, 147
Thorner, cimentul, 67
Thraustochytriaceae, mediu pentru cultivare, 94
Tilletia caries, conservare sub ulei, 164
T. controversa, mediu pentru sporulare, 145, 146
Tilletiaceae, viabilitate naturală, 158
Tionin, colorări diferenţiale cu, 56
Tipuri nomenclaturale,
culturi de referinţă ca, 181
conservare în herbare, 181
Tochinai, formula mediului, 145
Toluidine blue, colorarea nucleilor cu, 60
Tomate (suc) — sare — agar, formula mediului, 145

Torulopsis glabrata, mediu pentru izolare, 128
Transferul,
ciupercilor, 89
periodic, metodă conservare, 160
Tratament termic, plante în herbare, 179
Trichoderma, 33, 101
Trichomycetes, mediu pentru cultivare, 123
Trichophaea, mediu pentru cultivare, 139
Trichophyton mentagrophytes, mediu diferenţial, 142
T. rubrum, mediu diferenţial, 142
Trichothecium roseum,
mediu pentru cultivare, 126
mediu pentru sintetizarea trichothecinei, 125
Trifolium, colorare ciuperci în, 58
Trione — cereale — agar, formula mediului, 145
Trione — sintetic, formula mediului, 145
Triticum, colorarea ciupercilor în, 58, 59
Trypan blue,
colorarea citoplasmei cu, 53
colorări diferenţiale cu, 57, 59
colorări nuclei cu, 60
Tuberculi, izolare ciuperci din, 23, 25
Tubeuf, formula mediului, 146
Tuburi capilare, metodă izolări monosporale, 44
Tuburi perforate, îngropate, metodă izolare ciuperci din sol, 28
Turel, formula mediului, 146
Tuş „colorarea" ciupercilor cu, 55
Tyndalizare, 88
Tyroglyphus, acarian în culturile de ciuperci, 173

U

Ulei de parafină,
conservarea culturilor sub, 163
preparate microscopice cu, 66
Ullscheck, formula mediului, 146
Ulm (extract) — agar, formula mediului, 146
Umiditatea favorabilă ciupercilor, 90
Unghii, izolarea ciupercilor din, 37
Uredinales,
colectare, 8
colectare spori, 15
colorare în ţesuturile gazdei, 58
conservare, 159
culturi pe frunze detaşate, 150
în herbar, 180
izolare de pe frunze, 24
prelungirea viabilităţii naturale, 159
preparate microscopice, 65, 69
Uredospori, evidenţierea porilor, 61, 69
Urocystis, conservare, 162
U. tritici, conservare, 167
Uromyces dianthi, medii pentru cultivare, 120
U. phaseoli, conservare, 159
Urtica dioica, în medii de cultură, 128
Urzici (frunze) — agar, formula mediului, 128
Uscarea,
ciupercilor foliicole, 9, 10
macromicetelor cărnoase, 12, 13
Uscătoare pentru plante, 10
Ustilaginaceae, viabilitate naturală, 158
Ustilaginales,
colectare, 8
în herbar, 176, 180
izolare de pe frunze, 24
viabilitate naturală, 158
Ustilago avenae, liofilizare, 169
U. maydis, colorare în ţesuturile gazdei, 56, 57
U. nuda,
colorare în ţesuturile gazdei, 57, 59
viabilitate naturală, 158
U. tritici, colorare, 61
Usturoi — agar, formula mediului, 147

V

V-8 Juice — agar, formula mediului, 147
V-8 sintetic, formula mediului, 148
Van Tieghem, celule microcultură, 72
Venturia inaequalis,
conservare, 159
mediu pentru fructificare, 101, 126
mediu pentru sporulare, 101, 125
Verde de iod, colorări diferenţiale cu, 57
Verde Janus, colorarea citoplasmei cu, 55
Verde malahit, în medii de cultură, 104, 106
Verde malahit — Captan, formula mediului, 106
Verde de metil în glicerină gelatinată, 55
Verticillium,
colorare nuclei, 60
examinare în culturi, 51
mediu diferenţial, 136
mediu pentru izolare, 93
mediu pentru sporulare, 134
viabilitate naturală, 158
V. albo-atrum, mediu pentru identificare, 136
V. dahliae,
mediu pentru identificare, 136
mediu pentru izolare, 143
Viabilitate naturală, prelungire, 159
Violet de genţiană,
colorarea nucleilor cu, 60
în mediul Conn, 105
Vitis vinifera, colorarea ciupercilor în, 56
Vogel, formula mediului, 148
Vogel „minimal", formula mediului, 149
Volkonsky,
formula mediului, 149
metodă purificare culturi, 92

W

Waksman, formula mediului, 149
Waller, lut pentru etanşarea preparatelor, 66
Wallerite, mediu pentru preparate microscopice, 71
Warcup, formula mediului, 106
Warcup modificat, formula mediului, 106
Whiffen, formula mediului, 149
Whole mounts, vezi preparate integrale.
Williams & al., formula mediului, 149
Wills, formula mediului, 144
Wittman, mediu montare preparate microscopice, 66

X

Xenogloea eriophori, colorare nuclei, 60

Y

YpG, formula mediului, 110
YpSS, formula mediului, 110

Z

Zea mays, colorarea ciupercilor în, 56, 57
Zut, vezi cimentul Thorner.
Zygorrhynchus, 33

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE MUZEUL
Cota veche 30 | Preţul

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Redactor : Ing. GEORGETA SĂBĂDEANU
Tehnoredactor : TOMA ALEXANDRESCU

Apărut : 1974. Tiraj : 1 000+65. Hîrtie : Tipar înalt A/80 g/m², format 16/70×100. Coli editoriale : 17,47. Coli de tipar : 13,50. A : 12.714. C.Z. pentru bibliotecile mari : 578. C.Z. pentru bibliotecile mici : 57.

Lucrare executată sub comanda nr. 1113 la Oficiul Economic Central „Carpați", Întreprinderea poligrafică „Bucureștii-Noi", str. Hrisovului nr. 18 A, sectorul 8, București

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lei 18

ÎN EDITURA
CERES
au apărut :

Șuta Victoria ș.a.

PROTECȚIA POMILOR ȘI ARBUȘTILOR FRUCTIFERI

Raicu Cristina ș.a.

BOLILE ȘI DĂUNĂTORII DIN CULTURILE DE LEGUME PROTEJATE

Diaconu P.

DE LA FACTORII EREDITARI LA CODUL GENETIC

Ionescu Al.

POLUAREA ȘI EFECTELE SALE ÎN AGRICULTURĂ

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Editura „Ceres"